

Aus dem Institut für Klinische Chemie  
der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
(komm. Direktor: Prof. Dr. Dr. H. Wisser)

# **Phagozytose und Apoptose von Lymphozyten in der Immunpathogenese der HIV-Erkrankung**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von

**Philipp Kayßer**

aus

**Erlangen**

2002

Dekan: Prof. Dr. Dr. K. van Ackern  
Referent: Prof. Dr. Dr. H. Wisser

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Grundlagen des Immunsystems .....</b>	<b>6</b>
1.1.1 Induktion einer Immunantwort .....	6
1.1.2 Die T-Zell-vermittelte Immunität .....	7
1.1.3 Die humorale Immunität .....	8
1.1.4 Autoimmunität .....	8
<b>1.2 HIV und AIDS .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Verlauf von HIV-Infektion und AIDS .....	10
1.2.2 Epidemiologie .....	13
1.2.3 Aufbau und Replikationsmechanismen des HIV .....	14
1.2.4 Immunpathogenese der HIV-Erkrankung .....	15
1.2.5 Apoptose bei HIV-Infektion .....	18
1.2.6 Phagozytose von Lymphozyten bei HIV-Infektion .....	20
1.2.7 T-Zell-Homöostase bei HIV-Infektion .....	20
<b>1.3 Fragestellung.....</b>	<b>21</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Studienmodell .....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Patienten.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Hämatologische Basisuntersuchungen.....</b>	<b>22</b>
2.3.1 Präanalytik und Blutentnahme .....	22
2.3.2 Blutbild und Differentialblutbild .....	23
<b>2.4 Grundlagen der Durchflusszytometrie .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Viruslastbestimmung mittels bDNA-Assay .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6 Immunphänotypisierung .....</b>	<b>27</b>
2.6.1 Material.....	27
2.6.2 Versuchsdurchführung .....	28
2.6.3 Durchflusszytometrische Analyse.....	28
<b>2.7 Antikörperbeladung der Zellen.....</b>	<b>29</b>
2.7.1 Material.....	29
2.7.2 Versuchsdurchführung .....	30
2.7.3 Durchflusszytometrische Analyse.....	30
<b>2.8 Phagozytose von Lymphozyten durch Makrophagen .....</b>	<b>31</b>
2.8.1 Material.....	33
2.8.2 Versuchsdurchführung .....	34
2.8.3 Durchflusszytometrische Analyse.....	35
2.8.4 Mikroskopische Auswertung .....	36
<b>2.9 Viruslastbestimmung .....</b>	<b>37</b>

<b>2.10 Apoptose von Lymphozyten .....</b>	<b>38</b>
2.10.1 Material .....	38
2.10.2 Versuchsdurchführung .....	38
2.10.3 Durchflusszytometrische Analyse.....	39
<b>2.11 Statistische Auswertung .....</b>	<b>41</b>
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>42</b>
<b>3.1 Basiswerte der Patienten.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 Verlaufsparemeter der HIV-Infektion .....</b>	<b>43</b>
3.2.1 Verlust von T-Helferzellen .....	43
3.2.2 Autoantikörperbeladung der T-Helferzellen .....	44
3.2.3 Verhältnis zwischen Helferzellzahl und Autoantikörperbeladung .....	45
3.2.4 Zusammenhang zwischen T-Helferzellzahl und Viruslast.....	46
<b>3.3 Phagozytose von Lymphozyten durch autologe Makrophagen.....</b>	<b>47</b>
3.3.1 Messung der Phagozytose von T-Zellen im Durchflusszytometer .....	47
3.3.2 Validierung der Phagozytoserate im Mikroskop.....	53
3.3.3 Vergleich der im Durchflusszytometer und im Mikroskop gemessenen Phagozytoseraten .....	55
3.3.4 Ergebnisse zur Methodik des Phagozytoseassays .....	57
<b>3.4 Apoptose von Leukozyten.....</b>	<b>58</b>
3.4.1 Apoptose von T-Zellen bei gesunden Kontrollen .....	58
3.4.2 Apoptose von CD4+ Zellen bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten.....	60
3.4.3 Apoptose von CD8+ Zellen bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten.....	61
3.4.4 Apoptose von Monozyten bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten .....	62
3.4.5 Apoptose von NK-Zellen bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten .....	63
3.4.6 Zusammenfassender Vergleich der Apoptoseraten von Lymphozyten und Makrophagen.....	64
<b>3.5 Verhältnis zwischen Apoptose und Phagozytose bei Lymphozyten.....</b>	<b>65</b>
3.5.1 Verhältnis von Apoptose und Phagozytose bei CD4+ Zellen .....	65
3.5.2 Verhältnis von Apoptose und Phagozytose bei CD8+ Zellen .....	65
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1 Verlaufsparemeter der HIV-Infektion .....</b>	<b>66</b>
<b>4.2 Phagozytose von Lymphozyten .....</b>	<b>69</b>
<b>4.3 Validierung der Phagozytoserate .....</b>	<b>71</b>
<b>4.4 Apoptose von Leukozyten.....</b>	<b>73</b>
<b>4.5 Vergleich von Apoptose und Phagozytose bei Lymphozyten.....</b>	<b>75</b>
<b>4.6 Schlussfolgerung .....</b>	<b>76</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>77</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>79</b>
<b>7 LEBENS LAUF .....</b>	<b>91</b>
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>92</b>

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADC	analog/digital converter, Analog-/Digital-Wandler
ADCC	antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AICD	activation-induced cell death, durch Aktivierung ausgelöster Zelltod
AIDS	acquired immune deficiency syndrome, erworbenes Immunschwächesyndrom
ATG	Anti-Thymozyten-Globulin
bdNA	branched desoxyribonucleic acid, verzweigte Desoxyribonukleinsäure
CD	cluster of differentiation
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CMV	cytomegalovirus, Zytomegalievirus
CR	complement receptor, Komplementrezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay, enzymatischer Immunabsorptionstest
FasL	Fas-Ligand
Fc	fragment crystallizable, konstante Region eines Immunglobulinmoleküls
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1	Fluoreszenz 1, Grünfluoreszenz
FL2	Fluoreszenz 2, Orangefluoreszenz
FL3	Fluoreszenz 3, Rotfluoreszenz
FSC	forward scatter, Vorwärtsstreulicht
HAART	highly active antiretroviral therapy, hoch aktive antiretrovirale Therapie
HIV	human immune deficiency virus, humanes Immunschwähevirus
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-2	Interleukin-2
KLH	keyhole limpet hemocyanin, Hämocyanin von Lochschnecken
LTR	long terminal repeats, endständige Wiederholungen von DNA-Sequenzen
MCH	mean corpuscular hemoglobin, mittlerer Hb-Gehalt der Erythrozyten
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration, mittlere Hb-Konzentration der Erythrozyten
MCV	mean corpuscular volume, mittleres Erythrozytenvolumen
MHC	major histocompatibility complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
MOTT	mycobacterium other than tuberculosis, nicht zu Mycobacterium tuberculosis gehörende Mycobakterien
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OPV	oral polio vaccine, oraler Impfstoff gegen Kinderlähmung
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin 5
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
SIV	simian immunodeficiency virus, Immunschwähevirus bei Menschenaffen
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SSC	side scatter, Seitwärtsstreulicht
TNF	tumor necrosis factor, Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand, mit TNF assoziierter und Apoptose-induzierender Ligand

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Grundlagen des Immunsystems

Der menschliche Körper ist im Kontakt mit der Umwelt ständig einer Vielzahl Fremdstoffen ausgesetzt, seien es Mikroorganismen oder chemische Substanzen. Im Verlaufe der Evolution entwickelten lebende Organismen und insbesondere die Säugetiere unspezifische und spezifische Mechanismen, um diese ständige Bedrohung ihrer Existenz abzuwehren. Dies ist Aufgabe des Immunsystems. Es reagiert auf die unterschiedlichen Substanzen (Antigene) mit einer angepassten Immunantwort, einem fein regulierten, komplexen System zellulärer und molekularer Komponenten. Die für die Immunpathogenese der HIV-Infektion wesentlichen Mechanismen der Immunantwort werden in den folgenden Abschnitten in ihrer normalen Funktion beim gesunden Menschen beschrieben und im Kapitel 1.2 in ihrer möglichen Bedeutung für den Verlauf der HIV-Erkrankung dargestellt.

### 1.1.1 Induktion einer Immunantwort

Wir unterscheiden heute die angeborene von der erworbenen Immunität. Die zentrale Rolle in der Bereitstellung immunologischer Mechanismen besitzen die Leukozyten, die im Zusammenspiel ihrer Subpopulationen eine Immunantwort aufbauen, regulieren und schließlich auch beenden. Die Zellen des Immunsystems entwickeln durch komplexe Interaktions- und Regulationsvorgänge in zentralen lymphatischen Organen wie dem Thymus, den Lymphknoten und der Milz eine Toleranz gegen körpereigene Strukturen und bilden sich einen Pool von Antikörpern, die gegen körperfremde Proteine gerichtet sind und frei im Blut zirkulieren. Zur angeborenen Immunität tragen noch lokale Faktoren wie z. B. der pH-Wert von Körperoberflächen, sezernierte lytische Enzyme, rein mechanische Barrieren durch Endothelschranken oder mukoziliäre Clearance-Mechanismen im Respirationstrakt bei.

Aufgabe der angeborenen Immunität ist der Erstkontakt mit dem Krankheitserreger, falls möglich die Eliminierung oder die Eindämmung einer aufkeimenden Infektion. Das Immunsystem besitzt dazu zur Phagozytose fähige Zellen, die körperfremde Zellen oder Fremdstoffe erkennen, an sie binden und sie danach in sich aufnehmen, um sie zu verdauen. Die Phagozytose wird in der Frühphase einer Infektion hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen geleistet. Sie setzen durch Freisetzung von Cytokinen die Entzündungsreaktion in Gang und schaffen ein saures Milieu, in dem Abwehrprozesse effektiver ablaufen können. Der Reiz zur Phagozytose kann sowohl von bakteriellen Oberflächenstrukturen selbst ausgehen, aber auch von Antikörpern auf den fremden Partikeln, die über Rezeptoren der Phagozyten gebunden werden (siehe 1.2.6). Die Phagozytose und der damit verbundene Abbau der Fremdproteine ermöglicht es den Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen (dendritischen Zellen und B-Zellen), die Antigene den Zellen der adaptiven/spezifischen Immunantwort in geeigneter Form zu zeigen und so den Stimulus zur T-Zell-vermittelten oder humoralen Immunantwort zu geben (54). Die spezifische Immunantwort erreicht ihre Funktionstüchtigkeit nach vier bis sieben Tagen.

### 1.1.2 Die T-Zell-vermittelte Immunität

Die Antigenpräsentation durch Phagozyten, aber auch die Präsentation von in der Zellen produzierten Proteinen erfolgt durch Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) auf der Zelloberfläche. Dies ermöglicht die Interaktion mit T-Lymphozyten. Es gibt zwei Typen von MHC-Molekülen: MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle. MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren Peptide aus cytosolischen Proteinen, somit auch von sich intrazellulär replizierenden Viren wie bei der HIV-Infektion. MHC-Klasse-II-Moleküle binden an Peptide, die intrazellulär in Vesikeln vorkommen, z. B. Fragmente von phagozytierten Bakterien. Die Aktivierung der T-Lymphozyten geschieht - je nach Subklasse - entweder über MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Moleküle.

Der Kontakt eines naiven antigenspezifischen CD8-positiven T-Lymphozyten mit den von MHC-Klasse-I-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen gezeigten Peptiden von Pathogenen löst eine Aktivierung des Lymphozyten, eine Differenzierung in eine zytotoxische T-Zelle (CD8+) und eine klonale Expansion dieser Zelle aus. Die Antigene bei dieser Form der Aktivierung sind meist viraler Art. Bei Kontakt der aktivierten zytotoxischen T-Zelle mit der virusinfizierten Zelle wird der Zelltod der infizierten Zelle durch in dem T-Lymphozyten vorhandene Cytotoxine ausgelöst. Damit gelingt auch die Vernichtung der sich in der Zelle vermehrenden Viren. Die Sekretion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und anderen Faktoren durch die T-Lymphozyten hemmt zusätzlich die virale Replikation in befallenen Zellen (12).

Naive CD4-positive T-Zellen (T-Helferzellen) besitzen grundsätzlich zwei Wege, sich zu differenzieren und klonal zu expandieren: zu  $T_H1$ - oder  $T_H2$ -Zellen. Die Antigenpräsentation erfolgt über MHC-Klasse-II-Moleküle, die Entscheidung in den einen oder anderen Weg fällt beim Erstkontakt mit dem Antigen.  $T_H1$ -Helferzellen führen zu einer Makrophagenaktivierung, somit einem zellulären Weg der Immunantwort;  $T_H2$ -Helferzellen lösen die Bildung neutralisierender Antikörper durch B-Zellen aus, den humoralen Weg der Immunantwort. Diese zwei Wege kennzeichnen die zentrale Rolle der T-Helferzellen im Immunsystem. Die aktivierten Makrophagen vermögen Bakterien zu fressen und abzutöten. Der humorale Weg über die Bildung von Antikörpern wird im folgenden Abschnitt 1.1.3 beschrieben.

Die Aktivierung der T-Zellen durch Kontakt mit dem prozessierten Fremdpeptid erfordert neben der Bindung durch den T-Zellrezeptor die gleichzeitige Anwesenheit von costimulierenden Signalen, wie der Interaktion von CD28 (auf T-Lymphozyten) und B7-Glykoproteinen (auf antigenpräsentierenden Zellen). Die Aktivierung findet vor allem in den sekundären lymphatischen Organen (z. B. Lymphknoten) statt. Fehlt der costimulatorische Effekt, so verfällt die Zelle in Anergie und es entsteht Immuntoleranz gegenüber dem Antigen. Die Sekretion des Cytokins Interleukin-2 (IL-2) durch T-Zellen unterhält die Proliferation der aktivierten Zellen (55).

Die Balance zwischen der vorwiegend zytotoxischen  $T_H1$ -Antwort und der vorwiegend humoralen  $T_H2$ -Antwort wird je nach Erregertyp vor allem durch Cytokine des Monozytensystems gesteuert.

### 1.1.3 Die humorale Immunität

Die durch  $T_H2$ -Zellen aktivierten B-Zellen produzieren Antikörper, die auf drei Wegen zur Eliminierung des Pathogens aus dem Körper beitragen. Zum einen vermögen die Antikörper direkt an das Pathogen zu binden und es somit zu neutralisieren. Die Bindung eines Teils der gebildeten Antikörper an virale oder bakterielle Oberflächenstrukturen (sogenannte neutralisierende Antikörper) verhindert durch **Besetzung der Bindungsstellen**, mit denen die Pathogene ihren Kontakt zu körpereigenen Zellen aufbauen, die Infektion der Zielzelle. Der zweite Weg ist die **Opsonierung** der Erreger durch Beladung mit Antikörpern. Trifft ein mit Antikörpern beladenes Bakterium oder Virus auf einen Makrophagen, so kann dieser den Fc-Anteil des opsonierenden Antikörpers durch seine Fc-Rezeptoren erkennen, erhält damit einen Anreiz zur Phagozytose, nimmt den Erreger in sich auf und lysiert ihn durch diverse Mediatoren im Rahmen des sogenannten „respiratory burst“. Die opsonierenden Antikörper können weiterhin die Lyse des Pathogens durch Proteine des **Komplementsystems** induzieren - der dritte Weg. Diese Proteine bilden in ihrer Gesamtheit eine Kaskade, durch die sie schließlich Poren in die Membranen der Erreger einbauen und damit die Pathogene zerstören. Die Beladung mit Komplementfaktoren stellt zudem einen weiteren Reiz für phagozytierende Zellen dar, die Erreger aufzunehmen (vermittelt über spezielle Komplementrezeptoren - CR).

Die Produktion verschiedener Immunglobulinklassen (IgA, IgD, IgG und IgM) mit unterschiedlicher Molekülstruktur, das Vorhandensein bestimmter Klassen in den jeweiligen Kompartimenten des menschlichen Körpers, der Wechsel der gebildeten Klassen im Verlauf einer Infektion und die Affinitätsreifung unterstreichen die Adaptation des Immunsystems an wechselnde Anforderungen der Immunabwehr.

Infizierte Zellen, die auf der Oberfläche virale Proteine exprimieren und mit Antikörpern beladen sind, können ferner durch NK-Zellen (natürliche Killerzellen) direkt und ohne Vermittlung über MHC-Klasse-I-Moleküle (wie bei CD8+ Zellen) lysiert werden. NK-Zellen zählen weder zu den B- noch zu den T-Lymphozyten und besitzen Fc-Rezeptoren, die an den opsonierenden Antikörper binden und so den Kontakt zur infizierten Zelle aufbauen. Dies wird als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität bezeichnet (ADCC) (56).

### 1.1.4 Autoimmunität

Der Begriff der Autoimmunität bezeichnet eine fehlgeleitete Immunreaktion, die sich gegen körpereigene Strukturen richtet. Diese kann sowohl über zytotoxische T-Zellen als auch über die Bildung von Antikörpern gegen körpereigene Proteine ausgelöst werden.

Die Selektion von T-Lymphozyten im Thymus soll im Regelfalle die Bildung autoreaktiver Lymphozyten verhindern. Geraten autoreaktive T-Zellen dennoch in die Peripherie des Körpers und treffen dort auf ein ihrem Rezeptor komplementäres Antigen, so sollte der fehlende costimulatorische Effekt trotzdem eine Anergie der Zelle bewirken. Geschieht dies nicht und werden diese Zellen aktiviert (möglicherweise durch eine triggernde Infektion), so sind die aktivierten zytotoxischen T-Zellen in der Lage, eigenes - vermeintlich körperfremdes - Gewebe zu attackieren und zu zerstören. Eine Erkrankung, bei der dieser Weg eine Rolle zu spielen scheint, ist der Diabetes mellitus Typ I mit der Zerstörung von Inselzellen des Pankreas durch zytotoxische T-Zellen. Es handelt sich daher meist um das Antreffen eines Antigens, welches im Rahmen der Toleranzbildung im Thymus nicht präsentiert wurde.



Kreuzreaktive Antikörper, die sowohl auf Fremdprotein als auch auf körpereigenes Gewebe affin sind, können eine Entzündungsreaktion unterhalten, wie sie z. B. bei der Infektion mit Cocksackie-Viren vorkommt. Treffen Antikörper, die gegen diese Viren gerichtet sind, auf Herzmuskelzellen, die ein homologes Epitop besitzen, so werden die Herzmuskelzellen mit den kreuzreaktiven Antikörpern beladen. Dies kann so zu einer autoimmun bedingten Myokarditis führen (26).

Für die unter 1.1 beschriebenen immunologischen Mechanismen beim Gesunden finden sich charakteristische - durch die Infektion mit dem HI-Virus ausgelöste - funktionelle Defekte, die in ihrer Gesamtheit schließlich das Bild einer schweren, erworbenen Immunschwäche ausmachen. Die zentrale Rolle der T-Helferzellen in der Regulation der Immunantwort, die aktive Vernichtung virusinfizierter Zellen durch zytotoxische T-Zellen, die Möglichkeit der Auslösung einer Autoimmunreaktion durch mit HIV-Proteinen kreuzreaktive Antikörper und die Phagozytose ganzer, körpereigener Lymphozyten durch Makrophagen sind Gegenstand des folgenden Kapitels.

## 1.2 HIV und AIDS

Die ersten Berichte über Fälle der Immunschwächekrankheit AIDS wurden im Sommer 1981 publiziert (16). Damals häuften sich unter homosexuellen Männern in Kalifornien die seltenen bzw. atypischen Erkrankungen von *Pneumocystis carinii*-Pneumonien und Kaposi-Sarkomen (51). Sämtliche Patienten waren stark immungeschwächt und wiesen weitere opportunistische Infektionen sowie Krebserkrankungen auf (17). Nach Bildung einer Arbeitsgruppe der Centers for Disease Control and Prevention (CDC), die sowohl das Krankheitsbild definieren als auch die Quelle und Infektionswege analysieren sollte, wurden homo- (18) und heterosexuelle (42) Sexualkontakte als Übertragungswege nachgewiesen. Als weiterer Übertragungsweg zeigte sich die Möglichkeit einer Infektion über Blut- und Blutprodukte, hier hauptsächlich bei Hämophiliepatienten und i.v.-Drogenabhängigen (19).

### 1.2.1 Verlauf von HIV-Infektion und AIDS

Die **akute HIV-Infektion** umfasst die Zeit von der Virusinkorporation bis zum Auftreten von gegen das HI-Virus gerichteten Antikörpern im menschlichen Blut, der Serokonversion. In dieser Zeit vermehrt sich das HIV exzessiv, es kommt zu einer deutlichen Virämie mit bis zu  $10^6$  HIV-RNA-Kopien/ml Plasma (58). Die Patienten entwickeln zu 25 bis 65 % ein wenige Wochen andauerndes, der Mononucleosis infectiosa ähnliches Bild mit Fieber, Halsschmerzen, Lymphknotenschwellungen, Arthralgien, Ulcerationen im Anogenitalbereich und Oropharynx sowie in seltenen, schweren Fällen neurologischen Symptomen (Meningitis, Neuropathie) (75). Die Zahl der CD8-positiven Zellen im Blut steigt dabei an. Zeitgleich fällt die Zahl der CD4-positiven Zellen im peripheren Blut ab, um sich ab der Serokonversion wieder zu erholen, die Viruslast geht nach der Serokonversion zurück (45). Die Phase der akuten HIV-Infektion dauert bis zu 12 Wochen, der Nachweis der Infektion erfolgt durch einen Such- und einen Bestätigungstest. Als Suchtests werden Sandwich-ELISAs auf Anti-HIV-Antikörper eingesetzt, ältere diagnostische Assays haben ein Zeitfenster von 6 bis 12 Wochen, neuere der dritten Generation von 3 bis 4 Wochen nach der Infektion (23), in dem trotz stattgehabter Infektion der Nachweis negativ sein kann. Kombinierte Assays der vierten Generation detektieren neben den Anti-HIV-Antikörpern auch das p24-Antigen des HIV im Blut, sie vermögen das diagnostische Fenster bis auf maximal zwei Wochen zu verringern (99). Zur Bestätigung des Suchtests werden Western-Blots auf virale Proteine eingesetzt (p24, gp41, gp120/160) (78). Sollte bei negativen Suchtests trotzdem ein klinischer Verdacht auf eine HIV-Infektion bestehen, so kann der direkte Virusnachweis mit einer qualitativen PCR erfolgen (84). Die quantitative PCR und verwandte Verfahren wie der bDNA-Nachweis (siehe 2.5) dienen heute der routinemäßigen Bestimmung der Viruslast, da sich zeigte, dass die Bestimmung der Plasmaspiegel der HIV-RNA einen prognostischen Wert für den Erkrankungsverlauf hat (73) und damit die Effektivität der antiretroviralen Therapie überwacht werden kann.

Bei der Mehrzahl der Patienten schließt sich eine **asymptomatische Phase** an, in der sich die CD4-Zellzahl im peripheren Blut auf normalem oder leicht abgeschwächtem Niveau bewegt, die Viruslast ist niedrig (75). Die Zahl der CD8-positiven Zellen bleibt aufgrund der nie versiegenden HIV-Replikation im gesamten Verlauf der Erkrankung deutlich erhöht, weshalb das Verhältnis von CD4+ zu CD8+ Zellen (CD4/CD8-Ratio) bei der Erkrankung charakteristischerweise erniedrigt bleibt.

Bei Ausschluss anderer Erkrankungen ist das **Lymphadenopathiesyndrom** definiert als mindestens drei Monate andauernde Lymphknotenschwellung in mehr als zwei extra-inguinalen Lokalisationen. Dabei kann subjektives Wohlbefinden des Patienten bestehen (75).

Durch den Abfall der Immunkompetenz im Verlauf der HIV-Erkrankung werden die Patienten bei der **symptomatischen HIV-Erkrankung** anfällig für opportunistische Infektionen, vornehmlich der Haut und der Mundschleimhaut. Bis zu diesem Zeitpunkt sind die Patienten asymptomatisch, die Erkrankung ist nur durch Labortests gesichert. Die folgenden Beispiele nach CDC-Kategorie B zeigen das zu erwartende Spektrum (20).

Tabelle 1: Beispiele für Erkrankungen der klinischen Kategorie B der HIV-Infektion

Beispiele für Erkrankungen der klinischen Kategorie B
oropharyngeale oder vulvovaginale Candidiasis
cervicale Dysplasie oder Carcinoma in situ
konstitutionelle Symptome (persistierendes Fieber, Durchfall, Gewichtsverlust > 10 %)
orale Haarleukoplakie
Herpes zoster
idiopathische thrombozytopenische Purpura
Listeriose
periphere Neuropathie

Das erworbene Immunschwächesyndrom **AIDS** schließlich umfasst weitere Erkrankungen, wie sie für die Definition der CDC-Kategorie C publiziert wurden (20). Die Patienten sind schwerst erkrankt, in diesem Stadium sind es vorrangig klinische Belange, die die Therapie der Patienten leiten.

Tabelle 2: Beispiele für Erkrankungen der klinischen Kategorie C der HIV-Infektion (AIDS-definierende Erkrankungen)

Beispiele für Erkrankungen der klinischen Kategorie C (AIDS)
Candidiasis (bronchial, tracheal, ösophageal)
invasives Cervixcarcinom
Coccidioidomykose, Cryptosporidiose, Cryptococcose, Histoplasmose
Zytomegalie und CMV-Retinitis
HIV-Enzephalopathie
Herpes simplex (bronchial, tracheal, ösophageal)
Kaposi-Sarkom
Lymphome (Burkitt oder primär cerebral)
Mycobakteriosen (MOTT oder Tuberkulose)
Pneumocystis carinii-Pneumonie oder rezidivierende Pneumonien
cerebrale Toxoplasmose
progressive multifokale Leukenzephalopathie
HIV-Wasting-Syndrom

Die folgende Abbildung stellt (stark schematisiert) den Verlauf der HIV-Infektion für einen typischen Erkrankungsfall dar:

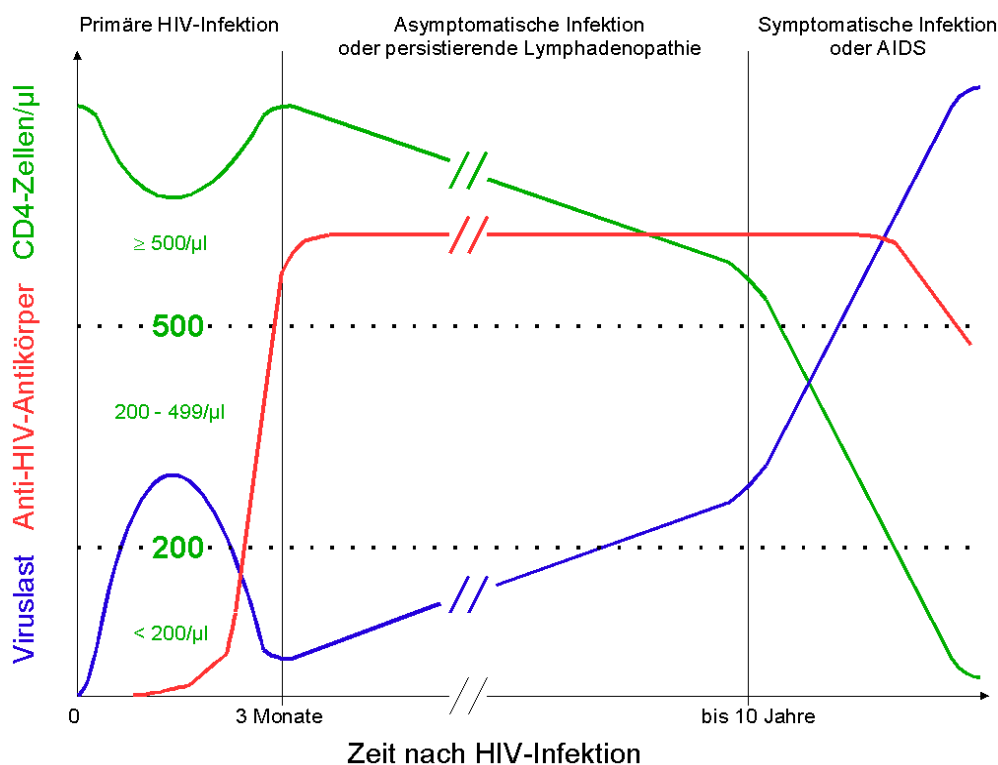


Abbildung 1: schematisierter Verlauf der unbehandelten HIV-Infektion

Die momentan gültige Klassifikation für HIV-Infektionen bei Erwachsenen der amerikanischen CDC kombiniert klinische Daten und den Laborparameter der CD4-Zellzahl im peripheren Blut nach je drei Kategorien (20):

Tabelle 3: CDC-Klassifikation der HIV-Erkrankung bei Erwachsenen von 1993

		CD4+ T-Lymphozyten/ $\mu\text{l}$		
Klinische Kategorien		Kategorie 1 $\geq 500$	Kategorie 2 200 - 499	Kategorie 3 $< 200$
	Kategorie A akute Infektion, asymptomatische Infektion oder Lymphadenopathiesyndrom	A1	A2	A3
	Kategorie B symptomatische Infektion, nicht A oder C	B1	B2	B3
	Kategorie C AIDS-definierende Erkrankungen	C1	C2	C3

Bei dem Erreichen einer klinischen Kategorie erfolgt kein Umstufen der Patienten mehr (d. h. ein der klinischen Kategorie C zugeordneter Patient wird nicht in Kategorie B zurückgestuft, sollte er die Bedingungen für Kategorie C nicht mehr erfüllen). Das generelle Management, die antiretrovirale Therapie und die Frequenz der Arztkonsultationen sollten den Stadien angepasst in Schwerpunktpraxen/-ambulanzen erfolgen (22).

Die aus dem progredienten Immundefekt resultierenden schweren opportunistischen Infektionen bzw. die Karzinome bewirken im Terminalstadium eine zunehmende Kachexie der Patienten, sie erliegen schließlich dem Infekt bzw. dem Karzinom oder versterben im Multiorganversagen. Die mittlere Überlebenszeit ab Beginn des AIDS beträgt zwischen 11,1 (Frauen) und 14,6 Monaten (Männer) (66), der typische dreiphasige Erkrankungsverlauf dauert insgesamt etwa 8 bis 12 Jahre, je nach Therapieverfügbarkeit und -ansprechen.

## 1.2.2 Epidemiologie

Obwohl die Epidemie wurde zuerst in den USA und Europa entdeckt wurde, zeigte sich retrospektiv, dass bereits in den späten 70er Jahren HIV-Infektionen in Zentralafrika präsent waren, hier mit heterosexuellen Sexualkontakten als Hauptübertragungsweg (2). Einer der frühesten nachgewiesenen Fälle einer HIV-Infektion ist der eines Seemanns aus Manchester, der 1959 an einem Immundefekt starb und in dessen asservierten Gewebeproben nachträglich das HIV-Genom nachgewiesen wurde (24).

Über den Ursprung der Erkrankung gibt es zwei besonders diskutierte Hypothesen:

- Eine geht davon aus, dass es eine Übertragung des simian immunodeficiency virus (SIV), eines dem HIV genomisch sehr ähnlichen Immunschwächevirus bei Primaten, gegeben haben muss. Die in manchen afrikanischen Staaten verbreitete Praxis der Jagd und des Verzehrs von Menschenaffen bietet die Gefahr, sich nach der Jagd beim Aufbrechen des Wildes und der Zubereitung zu schneiden und infektiöses Material zu inkorporieren. Daher wird diese Hypothese in der englischsprachigen Literatur als „cut-hunter theory“ bezeichnet (40).
- In den 50er Jahren fanden in den afrikanischen Staaten Masseneimpfungen gegen Polio mit einem oralen Impfstoff (OPV) statt, der in Affenställen kultiviert wurde. Durch Coinfektion mit dem damals unbekannten SIV könnte das Virus über den Impfstoff gegen Polio auf den Menschen übertragen worden sein. Dies wird als „OPV theory“ bezeichnet (63). Auch hierbei hätte das SIV zum HIV mutieren müssen.

Durch die zum Teil emotional geführte Diskussion um die Entstehung und den Ursprung der Erkrankung ergeben sich wissenschaftstheoretische Fragestellungen über den retrospektiven Nachweis der Ursachen solcher Epidemien und die Anforderungen im empirischen Bereich (70).

Das UNAIDS-Programm (<http://www.unaids.org>) der Vereinten Nationen schätzt die Prävalenz gegen Ende des Jahres 2001 auf 40 Millionen HIV-Infizierte weltweit, davon 2,7 Millionen Kinder unter 15 Jahren. Die Neuinfektionsrate beträgt etwa 5 Millionen pro Jahr, mehr als 90 % davon in Entwicklungsländern (hauptsächlich in Zentralafrika und Südostasien) (96).

Der HIV/AIDS-Bericht I/2001 des Robert-Koch-Institutes gibt ca. 38000 Infizierte in Deutschland für Ende 2001 an (ca. 29500 Männer, ca. 8500 Frauen und weniger als 400 Kinder), davon leben ca. 5000 Menschen mit AIDS. Die Zahl der Neuinfektionen für 2001 wird auf ca. 2000 geschätzt, mit 71 % bei homosexuellen Sexualkontakten unter Männern, 18 % bei heterosexuellen Kontakten und 10 % bei i.v.-Drogenabhängigen. Durch verbesserte The-

rapiermöglichkeiten ist die Zahl AIDS-Neuerkrankungen seit 1995 auf ca. 700 pro Jahr gesunken, wobei der Rückgang der Neuerkrankungsrate sich allerdings deutlich verlangsamt. Im Jahr 2001 sind etwa 600 Menschen an AIDS gestorben, seit Beginn der Epidemie Anfang der 80er Jahre haben sich in Deutschland ca. 60000 Menschen mit HIV infiziert, 19000 davon sind an AIDS verstorben (87).

### 1.2.3 Aufbau und Replikationsmechanismen des HIV

Das HI-Virus ist ein etwa 100 nm großes Retrovirus aus der Gruppe der Lentiviren. Es wurde bereits 1983 von Montagnier (8) und 1984 von Gallo (36) entdeckt. Das Virus existiert in zwei Typen (HIV-1 und HIV-2), wobei HIV-1 der in der westlichen Welt häufigere ist und sich in drei weitere Gruppen (M, N, O) sowie mehrere Subtypen unterteilen lässt (64). Das Virion enthält einen Kern, der vom Capsidprotein p24 umschlossen wird (in *gag* codiert). In ihm liegen zwei Kopien der viralen RNA, die Reverse Transkriptase (p55, p61), die Protease p10, die Integrase p34 und diverse andere Proteine. Das Matrixprotein p17 bildet die den Kern umschließende Matrix, die Hülle besteht aus einer Phospholipid-Doppelschicht mit einem transmembranalen Glykoprotein (gp41) und dem nichtkovalent gebundenen Glykoprotein gp120 an der Oberfläche.

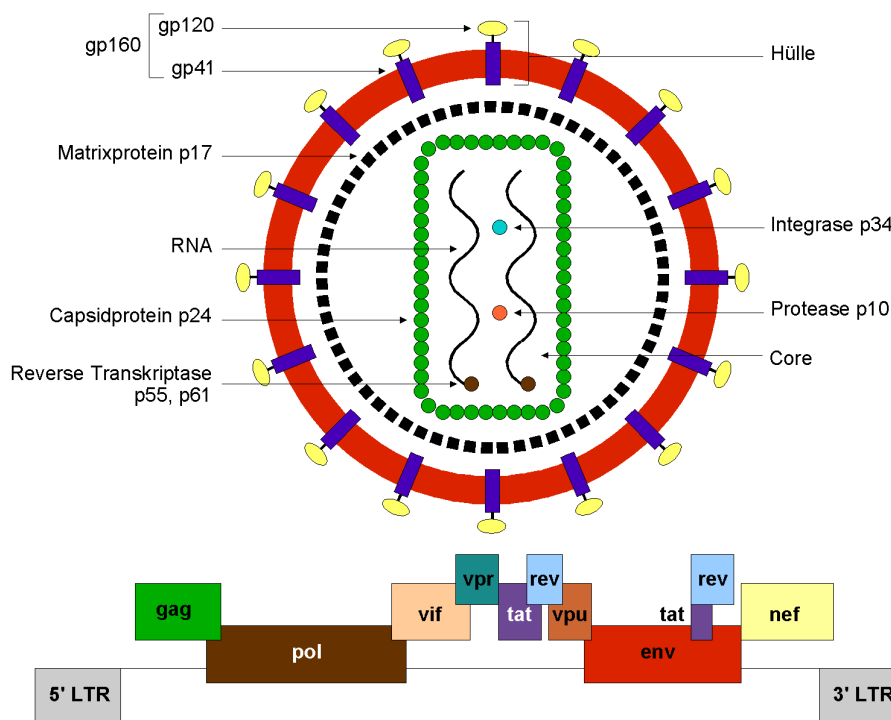


Abbildung 2: Aufbau und Genkarte des HIV

Über die in *env* codierten Hüllproteine gp120/gp41 bindet das HIV spezifisch an CD4 auf CD4-tragenden Zellen (T-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen). Es wurde gezeigt, dass sowohl das Blockieren von gp120 mit löslichem CD4 als auch das Blockieren von CD4 mit spezifischen Antikörpern die Infektiosität des HIV reduziert (15). Die Verschmelzung der Hüllen von Virus und Wirtszelle benötigt ferner Corezeptoren wie Fusin für die Infektion von T-Zellen (34) oder CC-CKR5 für Makrophagen (dieser bindet Chemokine wie RANTES, Mip-1 $\alpha$  und Mip-1 $\beta$ ) (3). Nach der Fusion beider Membranen ist das Virus in die Zelle gelangt. Ebenso existieren jedoch Beweise für Makropinozytose als Weg für das Eindringen des Virus in Makrophagen (69).

Die in *pol* codierte Reverse Transkriptase ist eine heterodimere Polymerase aus zwei Untereinheiten (p51 und p66), welche die virale RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) umkopiert (59). Versehen mit sich wiederholenden DNA-Sequenzen an den Enden, sogenannten long terminal repeats (LTR), baut die Integrase p34 die cDNA als Provirus mit einer Länge von etwa 9,8 Kilobasen in die DNA der Wirtszelle ein (89).

Das Provirus nutzt zur Expression der viralen Proteine die Transkriptionsmechanismen der Wirtszelle wie auch die Transkriptionsfaktoren Sp1 und NFκB. Das in *tat* codierte Protein dient der Aktivierung der Transkription, indem es die Elongation fördert, so dass komplette, längere Transkripte entstehen können (88). Das RNA-bindende Protein, das in *rev* codiert ist, scheint den Übergang der frühen Phase der HIV-Replikation in die späte Phase zu modulieren (62).

Die Protease p10 trennt bei der Produktion der Virusbestandteile aus einem durch Versetzen des Ableserasters entstandenen *Gag-Pol*-Vorläuferprotein (p160) die Protease p10 (erzeugt sich also quasi selbst), die Reverse Transkriptase (p50), die RNase H (p15) und die Integrase (p31) ab. Die Kenntnis dieser Funktion führte zur Entwicklung der Klasse der Transkriptaseinhibitoren in der Therapie der HIV-Erkrankung (5).

Die zusätzlichen Proteine *Nef*, *Vif*, *Vpr* und *Vpu* (bei HIV-2 *Vpx*) sind nicht absolut essentiell für die Virusreplikation, scheinen aber wichtige Virulenzfaktoren zu sein. *Nef* reguliert post-translationell die Expression von CD4 auf der Zelloberfläche herunter (37) und vermindert die Expression von MHC-Klasse-I auf den infizierten Zellen, was die Elimination durch zytotoxische T-Zellen erschwert (91). Das Produkt von *nef* erhöht außerdem die Infektiosität der Viruspartikel um bis zu Faktor 10 (74).

Nach Produktion der Virusproteine im Endoplasmatischen Retikulum der Wirtszelle, der evtl. Glykosylierung, der Komplettierung des Kernes und dem Transport an die Zelloberfläche sprossen (engl. „budding“) die fertigen Virione an der Membran der Zelle.

Die Mutationsfrequenz des Virusgenoms ist - verursacht durch ungenaues Umkopieren durch die Reverse Transkriptase - sehr hoch. Die Spanne der CD4+ Zellen reicht zudem von Makrophagen über T-Zellen bis hin zur Astroglia, somit ergeben sich auch verschiedene virale Reservoirs von der Schleimhaut bis zum zentralen Nervensystem (82, 61).

## 1.2.4 Immunpathogenese der HIV-Erkrankung

Der Abfall der Zahl der CD4-positiven Zellen im peripheren Blut der infizierten Patienten ist seit Entdeckung der Erkrankung der zentrale Punkt immunologischer Untersuchungen zur Pathogenese der HIV-Erkrankung. Durch die zentrale Rolle der T-Helferzellen in der Steuerung der Immunantwort wirkt sich die Verminderung ihrer Zahl und ihr Funktionsverlust (Stimulationsfähigkeit) so entscheidend auf das Immunsystem aus. Die wechselnde Rolle immunologischer, virologischer und konstitutioneller (genetischer) Faktoren resultiert in klinisch unterschiedlichen Verläufen der Infektion. Die Mehrzahl der Patienten (ca. 70 %) zeigt den typischen Verlauf mit langsamem Abfall der Helferzellzahl und Ansteigen der Viruslast und einer etwa 10-jährigen Dauer bis zum Auftreten von Symptomen des AIDS. Etwa 20 % der Patienten entwickeln das AIDS in weniger als 5 Jahren, sie werden im Englischen als „rapid progressors“ bezeichnet. Die restlichen ca. 10 % zeigen einen langsamen Erkrankungsverlauf („slow progressors“). Lediglich unter 1 % der Infizierten besitzen über mehr als zehn Jahre eine effektive Kontrolle der Infektion, liegen mit ihrer T-Helferzellzahl über 500/μl und mit der Viruslast unter der Nachweisgrenze. Sie gelten als „long-term nonprogressors“ (82).

Den schon im vorigen Kapitel gezeigten molekularen Mechanismen der Infektion soll hier ein Überblick über die immunologischen Effekte im Verlauf der Erkrankung folgen. Die Mehrzahl der immunologischen Ereignisse spielt sich in peripheren lymphatischen Organen, den Lymphknoten ab. Hier vermehrt sich das Virus und hier sitzen auch die Reservoirs der chronischen HIV-Infektion (61, 104). Die bisherigen Kenntnisse über Mechanismen des Abfalles der Zahl der CD4<sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut resultierten meist aus in-vitro-Experimenten mit eingeschränktem Bezug zu lymphatischen Organen. In diesem Licht sollten auch die nun erwähnten Modelle gesehen werden.

Schon nachdem es in den frühen 80er Jahren gelang, das HIV in Zelllinien zu kultivieren, sah man, dass die verschiedenen Virusisolate eine unterschiedliche Fähigkeit besaßen, die Zellen zu zerstören. Die Ergebnisse von Ho et al. (48) bei der Untersuchung der Effekte von Proteaseinhibitoren zur Therapie wurden dahingehend interpretiert, dass bei Patienten ohne hoch aktive antiretrovirale Therapie (HAART) die de-novo-Infektion reifer CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu einer exzessiven Virusvermehrung mit der Zerstörung von bis zu  $2 \cdot 10^9$  Zellen pro Tag führte („high turnover disease“). Die Gabe der Proteaseinhibitoren senkte die Viruslast deutlich und führte zur Restitution der Helferzellzahl. Der zytopathische Effekt allein kann jedoch nicht die Veränderungen in der prozentualen Zusammensetzung der Helferzellpopulation (nach Aktivierungsmarkern) und die daraus folgenden funktionellen Defekte erklären.

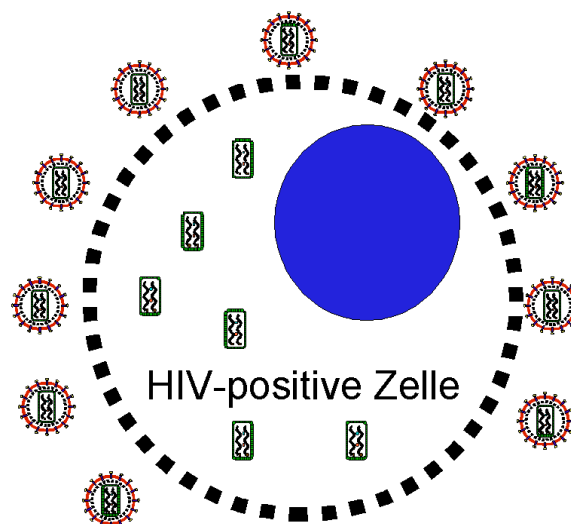


Abbildung 3: zytopathischer Effekt durch sprossende Viruspartikel an einer infizierten Zelle

Ein weiterer, ebenfalls lange bekannter Effekt ist die Bildung von Synzytien von CD4<sup>+</sup>, infizierten und CD4<sup>+</sup>, uninfizierten Zellen. Die zelluläre Interaktion erfolgt hier über gp120 auf der Oberfläche infizierter Zellen, das den Kontakt mit CD4 auf nicht-infizierten Zellen herstellt und so die Synzytienbildung vermitteln kann. Obwohl in vivo nur von nachrangiger Bedeutung (81), stellt die Bildung von Synzytien ein praktisch bedeutsames Modell zur Untersuchung neuer Therapieansätze in vitro dar (95).



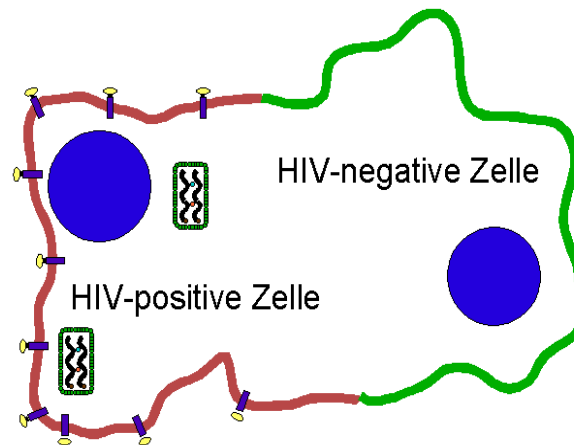


Abbildung 4: Synzytienbildung zwischen infizierter und nicht infizierter Zelle

CD8<sup>+</sup> T-Zellen leisten ihre effektivste Arbeit, indem sie HIV-infizierte Zellen noch vor der Herstellung neuer Viruspartikel zerstören. Das Zeitfenster dafür beträgt etwa 12 Stunden vom Beginn der viralen Proteinsynthese bis zum Sprossen der ersten Viruspartikel an der Zelloberfläche (105). Die ausgeprägte Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen wird während der gesamten Phase der unbehandelten HIV-Infektion deutlich: Patienten mit mehr *Env*-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten im peripheren Blut zeigten nur etwa ein Drittel der Viruslast von Patienten mit wenigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (77). Ebenso korrelierte eine initial hohe Zahl an zytotoxischen T-Zellen mit einem langsameren Abfall der CD4<sup>+</sup> Zellzahl im weiteren Verlauf der Erkrankung. Neuere Untersuchungen zur Kinetik des Abfalles der CD4<sup>+</sup> Zellzahl zeigen, dass CD4<sup>+</sup> Zellen sowohl eine geringere Lebensdauer haben, als auch - ohne HAART - deutlich vermindert nachgebildet werden. Dies trifft für CD8<sup>+</sup> Zellen nicht zu. Beide T-Zell-Unterklassen sollten daher grundsätzlich getrennt betrachtet werden (44).

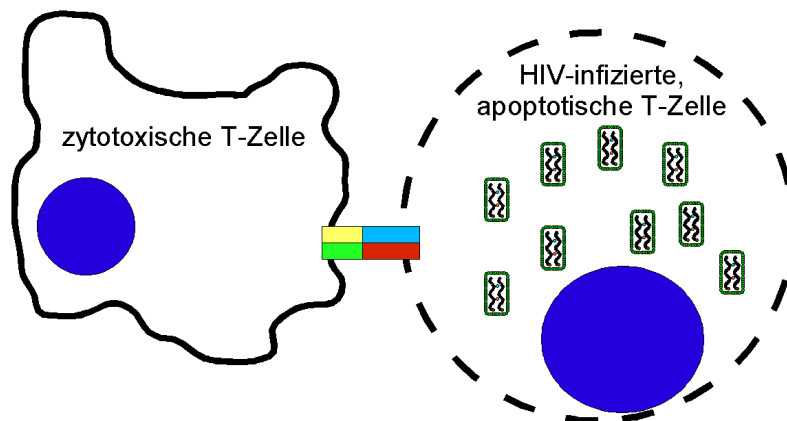


Abbildung 5: T-Zell-vermittelte Zytotoxizität bzw. Induktion von Apoptose

Daniel et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen der Beladung von CD4<sup>+</sup> Zellen mit Autoantikörpern und dem Abfall der Helferzellzahl im Blut (27). Die durch B-Zell-Stimulierung im Rahmen einer T<sub>H</sub>2-dominierten Immunantwort induzierte Produktion von (Auto-) Antikörpern führt zur Beladung von CD4<sup>+</sup> Zellen mit Immunkomplexen aus gp120/CD4/IgG/C3, die einen Phagozytosereiz darstellen (80). Makrophagen geraten in Kontakt mit derart beladenen Zellen, phagozytieren diese und eliminieren sie somit aus der Zirkulation.

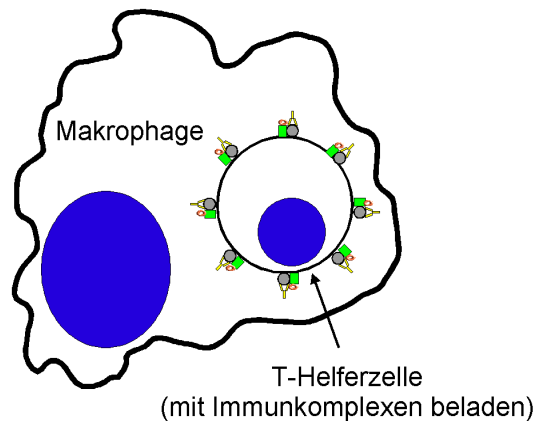


Abbildung 6: Phagozytose von Lymphozyten durch Makrophagen

Während der HIV-Infektion können Antikörper gegen verschiedenste körpereigene Gewebe gebildet werden (26). Daniel et al. wiesen durch Quer- und Längsschnittuntersuchungen mit Autoantikörpern assoziierte T-Helferzelldefekte, Makrophagenstimulation und den Abfall der Helferzellzahl nach (101, 28, 27). Die Autoantikörper bzw. die Immunkomplexe treten dabei jedoch nicht isoliert nur auf der Oberfläche von Zellen auf, sondern zirkulieren auch frei im Plasma und können sich daher leicht auf CD4+ Zellen aggregieren. Dies kann zur Elimination auch von nicht infizierten, jedoch komplexbeladenen Zellen führen.

Die HIV-Infektion weist in Bezug auf die Bildung von Autoantikörpern und Elimination von Leukozyten Parallelen zu anderen Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes auf (siehe 1.2.6).

### 1.2.5 Apoptose bei HIV-Infektion

Der Zelltod kann grundsätzlich auf zwei verschiedene Arten geschehen. Die **Nekrose** bezeichnet den Zelltod, der durch Einwirkung physikalischer oder chemischer Noxen eine Funktionsuntüchtigkeit der die Zellhomöostase unterhaltenden Faktoren bedingt. Die Zelle geht zugrunde und wird von phagozytierenden Zellen abgebaut. Die **Apoptose** oder **programmierter Zelltod** bezeichnet einen Mechanismus, der auf einem in der Zelle determinierten Verfahren zur Selbstvernichtung beruht. Die Apoptose ist fein reguliert und essentiell für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes an Zellen im gesamten Organismus. Sie verhindert die übermäßige Vermehrung aktivierter oder autoreaktiver Lymphozyten und trägt somit dazu bei, die Entstehung von Krebs- oder Autoimmunerkrankungen zu verhindern (s. o.). Die Apoptose kann von äußeren Faktoren (z. B. CD8-positiven Zellen) induziert werden.

Vier verschiedene zelluläre Rezeptoren zur Apoptoseinduktion sind bekannt und werden auf menschlichen Zellen exprimiert: Fas-Rezeptor (90), Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-Rezeptor) (32) und die TRAIL/APO 2-L-Rezeptoren 1 und 2 (102). Die komplementären auf Apoptose induzierenden Zellen vorhandenen Liganden sind Fas-Ligand (FasL), TNF und TRAIL/APO 2-L. Intrazellulär wird bei der Auslösung der Apoptose ein komplexes System von Proteasen (sogenannte Caspasen) aktiviert, die letztendlich die für die Apoptose charakteristischen Veränderungen in der Zelle veranlassen und damit zu deren Tode führen. Neben dem rezeptorvermittelten Weg führt ein Alternativweg ebenfalls zur Apoptose: Chemotherapeutika und ultraviolette/ionisierende Strahlung setzen - durch Schädigung der Mitochondrien der Zelle - ebenfalls die Wirkung der Proteasen in Gang (14). Den Schutz vor fehlerhafter Apoptoseinduktion gewährleisten intrazelluläre Proteine wie c-FLIP und Bcl2 durch Unterbrechung der Proteasenkaskade (52).

Messbar wird Apoptose durch kennzeichnende Veränderungen der Zellmorphologie. Das Chromatin der Zelle wird dichter, der Zytoplasmasaum geringer, die Zellmembranen haften zusammen und sogenannte „apoptotic bodies“ werden abgeschnürt. Im Durchflusszytometer gelingt die Detektion z. B. durch Anfärbung von normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran vorhandenem Phosphatidylserin, das bei Apoptose zum Zelläußeren „umklappt“ und dort durch fluoreszenzmarkiertes Annexin-V extrazellulär anfärbbar wird (97). Das „Umklappen“ wird durch den Wegfall eines aktiven, energieabhängigen Mechanismus ausgelöst, da das energieliefernde Substrat beim Sterben der Zelle bzw. der Mitochondrien wegfällt.

Die Apoptose wurde schon Anfang der 90er Jahre als möglicher Mechanismus der Verminderung der CD4-Zellzahl vorgeschlagen (4) und gilt heute als einer der wesentlichen Faktoren für die Elimination von Lymphozyten im Verlauf der HIV-Infektion.

T-Zellen von HIV-positiven Patienten zeigen eine erhöhte Expression von Fas und damit auch eine gesteigerte Rate an Fas-vermittelter Apoptose (71). Gleichzeitig wird FasL auf mononukleären Zellen hoch reguliert (93), die Patienten haben mehr löslichen FasL im Plasma, was gut mit der Viruslast korreliert (50).

HIV-Infizierte in symptomatischen Stadien besitzen erhöhte Serum-TNF-Spiegel (106), asymptomatische Patienten nicht (49); der TNF scheint in infizierten Leukozyten produziert zu werden (98). Die durch TNF induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B könnte einen Circulus vitiosus unterhalten, der über vermehrte Virusproduktion zu höherer TNF-Expression und damit wieder über NF $\kappa$ B zu höherer Viruslast führen würde (41).

Über die Rolle von TRAIL/APO 2-L-Rezeptoren in der Apoptose von HIV-infizierten Zellen ist bekannt, dass Zellen (Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen) von HIV-Positiven im Gegensatz zu Zellen gesunder Kontrollen mit TRAIL/APO 2-L im in-vitro-Experiment in höherem Maße in Apoptose zu bringen sind (57, 68).

Es wurde gezeigt, dass die Kreuzvernetzung von gp120, CD4 und den Chemokin-Corezeptoren zu einer erhöhten Anfälligkeit HIV-infizierter Zellen für Fas-vermittelte Apoptose führt (6). Aber nicht nur infizierte Zellen, sondern auch gesunde können durch zirkulierende, freie Immunkomplexe zur Apoptose gebracht werden (1). Für die HIV-Proteine *Tat*, *Nef* und *Vpr* wurde ebenfalls eine die Apoptose induzierende Wirkung gezeigt, jeweils über unterschiedliche Mechanismen (9, 107, 94).

Aktiviert man CD4-positive Zellen von gesunden und HIV-infizierten Personen, so zeigen die der HIV-Infizierten eine deutlich erhöhte Apoptoserate, dies wird im Englischen als activation-induced cell death (AICD) bezeichnet (38). AICD von Lymphozyten scheint über das Fas/FasL-System vermittelt zu werden (93).

Die oben dargestellten Wege der Apoptoseinduktion können durch Makrophagen ausgelöst werden, die erhöht FasL exprimieren. Es scheint sogar so zu sein, dass die Makrophagen vermehrt nicht-infizierte Zellen zur Apoptose bringen (46) und dadurch einen wesentlichen Einfluss auf den Abfall der Helferzellzahl im peripheren Blut haben. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Apoptose bei HIV-Patienten gut mit den klinischen Stadien der Infektion korreliert (86).

### 1.2.6 Phagozytose von Lymphozyten bei HIV-Infektion

Eine der Aufgaben von Makrophagen ist die Phagozytose von alternden Blutzellen in der Milz. Hier werden alte, funktionsuntüchtige Blutzellen abgebaut und aus der Zirkulation entfernt, unter anderem über die Erkennung einer veränderten Membranzusammensetzung.

Die Makrophagenaktivität im Verlaufe der HIV-Infektion und daraus resultierende Funktionsdefekte sind Gegenstand vieler Untersuchungen, da sich bei opportunistischen Infektionen wie Mykosen häufig ein funktioneller Defekt von Monozyten/Makrophagen nachweisen lässt (85). Der Zusammenhang zwischen Makrophagenfunktion und allgemeinen Verlaufsparametern der Infektion wie Viruslast und CD4+ Zellzahl ist zwar nur wenig untersucht (7, 33), dennoch wird - auch aus klinischen Aspekten - von einer Abnahme der Funktion mit fortschreitendem Immundefekt ausgegangen.

Aus den 70er Jahren existieren Beschreibungen, die eine Phagozytose von Lymphozyten durch Makrophagen in der Lymphe von Schafen zeigen (104). Cossel dokumentierte 1977 ebenfalls die Phagozytose ganzer Lymphozyten durch Kupffersche Sternzellen in Transplantatlebern beim Schwein (25).

Beim LE-Phänomen des systemischen Lupus erythematoses wurde in vitro die Phagozytose von mit antinukleären Antikörpern beladenen Zellkernen gezeigt (10), ebenso gibt es Hinweise auf die Assoziation zwischen Autoantikörpern und einer Lymphopenie beim SLE (103).

Die Phagozytose von Lymphozyten bei der HIV-Infektion wurde von M. C. Müller im Rahmen seiner Dissertation untersucht (80). Er zeigte eine von der Immunglobulinbeladung der Lymphozyten abhängige, signifikant erhöhte Phagozytoserate bei HIV-positiven Patienten und schließt damit auf einen weiteren pathogenetischen Mechanismus zur Abnahme der Zahl der Helferzellen im peripheren Blut.

### 1.2.7 T-Zell-Homöostase bei HIV-Infektion

Während der Zeit nach der primären HIV-Infektion, also der Latenzphase oder dem AIDS besteht sowohl ein vermehrter Zelltod als auch eine verringerte Neubildung der T-Lymphozyten. Im peripheren Blut erscheint dabei nur ein Teil der im gesamten Körper vorhandenen Zellen und ist einer leichten Untersuchung zugänglich (44). Es wird jedoch von einem massiven Turnover sowohl der Helfer- als auch der zytotoxischen T-Zellen ausgegangen (76). Die de-novo-Synthese CD4+ Zellen in Thymus und Lymphknoten kann bei einer unbehandelten HIV-Infektion diesem Turnover nicht Schritt halten, die T-Helferzellzahl sinkt wellenförmig ab. Die Zahl der zytotoxischen T-Zellen ist über den gesamten Verlauf der Infektion erhöht. Erst seit wenigen Jahren ist diese Kinetik einer Untersuchung zugänglich und es existieren mathematische Modelle zur Simulation (Review in 72).

Es wurde gezeigt, dass der Anstieg des Gesamtbestandes von T-Lymphozyten im Körper nach Einleitung einer HAART eng mit der Kinetik proliferierender CD4+ und CD8+ Zellen korreliert. Die Patienten scheinen also ihre entleerten Reservoirs von Lymphozyten unter HAART durch de-novo-Synthese wieder aufzufüllen (35), bieten aber dadurch auch einen Pool für vermehrte Virusreplikation z. B. in Lymphknoten (61). Fleury et al. gehen aufgrund ihrer Untersuchungen davon aus, dass das periphere Blut ein gutes Abbild der Lymphozytenpopulationen im Gesamtkörper leistet (35).

## 1.3 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Zelldepletion in der Immunpathogenese der HIV-Infektion im Hinblick auf Mechanismen, die im Verdacht stehen, diesen Zellverlust auszulösen.

Ausgehend von der inzwischen weit verbreiteten Akzeptanz der Apoptose als einem der wesentlichen Mechanismen des Abfalles der T-Helferzellzahl im Blut von HIV-Infizierten sollte die Phagozytose von Lymphozyten durch autologe Makrophagen als weitere Hypothese vergleichend untersucht und ein Zusammenhang geprüft werden.

Die Phagozytose von Lymphozyten ist ein bisher nur wenig untersuchter Bereich der HIV-Infektion, obwohl durch die bereits nachgewiesene Autoantikörper- und Komplementbeladung ein schlüssiges Modell zur möglichen Phagozytoseinduktion vorliegt. Da in Vorarbeiten auch eine IgG-Beladung von CD8<sup>+</sup> Zellen - neben der der CD4<sup>+</sup> Zellen - gefunden wurde, war die Frage der unterschiedlichen Elimination der T-Zell-Subpopulationen zusätzlich zu untersuchen.

Die Überstimulierung des Immunsystems mit der Bildung von lymphozytenassoziierten Antikörpern, die dadurch erzeugte Autoimmunität und Verlaufsparemeter der HIV-Infektion wie CD4-Zellzahl und Viruslast sollten bestimmt, bestätigt und ihre Rolle für die Induktion von Apoptose und Phagozytose analysiert werden. Dabei sollte auch die Frage geklärt werden, inwieweit Viruslast, Apoptose und Phagozytose unabhängige Mechanismen in der Immunpathogenese darstellen.

Die Messung der Phagozytose sollte durch einen neu zu entwickelnden Assay zur Messung der Phagozytose von Lymphozyten durch Makrophagen im Durchflusszytometer erfolgen, eine zentrale Aufgabe dieser Dissertation. Ein ähnlicher lichtmikroskopischer Test wurde im Institut für Klinische Chemie bereits durch M. C. Müller entwickelt und evaluiert (80) und sollte dem Prinzip nach zur Validierung des neuen Tests dienen.

Die Messung der Apoptose der Lymphozytensubpopulationen sollte durch ein im Institut für Klinische Chemie etabliertes Verfahren (die Messung der Phosphatidylserinexpression apoptotischer Zellen) parallel zur Bestimmung der Phagozytose durchgeführt werden.

Die zeitnahe Bestimmung von Apoptose und Phagozytose im Durchflusszytometer sollte eine Untersuchung größerer Zellzahlen sowie die spezifische Markierung und Analyse von Lymphozytensubpopulationen ermöglichen und diese auf eine breitere statische Basis als bei der manuellen Auszählung von Zellen auf Objektträgern in der Dissertation von M. C. Müller (80) stellen.

## 2 MATERIAL UND METHODIK

### 2.1 Studienmodell

Angelegt als Querschnittstudie umfasste die Untersuchung insgesamt 49 HIV-positive, erwachsene Patienten und elf gesunde, erwachsene Kontrollpersonen.

In der Untersuchung wurde ein in-vitro-Test zur Phagozytose von autologen Lymphozyten durch patienteneigene Makrophagen, gewonnen aus der Kultur adhärenter Monozyten, durchgeführt. Diese Messung erfolgte, wie die parallele Apoptosemessung der Leukozyten, im Durchflusszytometer. Zusätzlich wurden noch das Blutbild, die Viruslast, die T-Helferzellzahl und die IgG-Beladung der CD4+ Zellen ermittelt.

### 2.2 Patienten

Das periphere Blut der HIV-infizierten Patienten wurde in Zusammenarbeit mit einer Mannheimer Schwerpunktpraxis für Hämatologie/Onkologie (Praxis Dres. Brust, Schuster, Queißer) gewonnen. Die Kontrollpersonen entstammten dem Kollektiv des Institutes für Klinische Chemie Mannheim, die am jeweiligen Versuchstag als Kontrollpersonen für Routinebestimmungen im Hause Blut spendeten. Die erwachsenen HIV-Infizierten besuchten die Praxis im Rahmen ihrer regelmäßigen Arztbesuche zur ambulanten Kontrolle von Krankheitsverlauf und Therapie. Um ein möglichst breites Kollektiv zu untersuchen, unterlagen die Patienten außer ihrem Alter keinerlei Ein- bzw. Ausschlusskriterien, repräsentierten somit alle Stadien der HIV-Infektion bzw. des AIDS und erklärten sich mit der Abnahme eines zusätzlichen NH<sub>4</sub>-Heparin-Röhrchens zu Forschungszwecken einverstanden. Das zusätzlich entnommene Blut diente ausschließlich Belangen dieser Untersuchung. Letztlich wurden nur die in der mikroskopischen Analyse des Phagozytoseassays hergestellten Bodenplatten auf die weiter unten beschriebene Weise asserviert.

### 2.3 Hämatologische Basisuntersuchungen

#### 2.3.1 Präanalytik und Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte stets morgens zwischen 08<sup>00</sup> und 11<sup>00</sup> Uhr, um den Einfluss zirkadianer Schwankungen der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blutbild zu eliminieren. Zur Blutentnahme wurden handelsübliche Venenpunktionsbestecke der Firma Sarstedt verwandt (Monovetten-System). Den Patienten wurde zusätzlich zum Umfang der von der Praxis benötigten Blutproben eine weitere 10 ml NH<sub>4</sub>-Heparin-Monovette abgenommen, diese Menge von 10 ml wurde hauptsächlich für die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll benötigt. Die Mitarbeiter der Praxis beschrifteten die Proben zwecks Anonymisierung durch ein Namenskürzel bestehend aus dem ersten Buchstaben des Vornamens und dem ersten des Nachnamens, bei Verwechslungsgefahr auch durch weitere Buchstaben. Die Abholung der Proben in der Praxis wurde durch den Untersuchenden selbst oder eine Mitarbeiterin des Institutes für Klinische Chemie gegen 12<sup>00</sup> Uhr gewährleistet. Die Proben wurden zum Transport

in eine Plastiktüte verpackt und in eine Isolationsschachtel aus Styropor® gegeben, um während des 10-minütigen Transportes zum Institut für Klinische Chemie Sicherheit und Konstanz bei Raumtemperatur aufrecht zu erhalten. Bei Ankunft im Institut für klinische Chemie wurden die Proben orientierend auf Hämolyse, Temperatur und geronnene Anteile überprüft. Offensichtlich zu warmes/kaltes, hämolytisches oder geronnenes Blut wurde verworfen, was bei einer einzigen Probe in der gesamten Untersuchung erfolgte. Die Präanalytik folgte insgesamt den in (21) gegebenen Empfehlungen.

### 2.3.2 Blutbild und Differentialblutbild

Im Hämatologieautomaten Cell-Dyn CD 3500 (Abbott GmbH, Wiesbaden) wurden Blutbild (Anzahl der Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Anzahl der Leuko- und Thrombozyten) sowie das Differentialblutbild erstellt (prozentualer Anteil neutrophiler Granulozyten, eosinophiler Granulozyten, basophiler Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten an der Gesamtzahl weißer Blutkörperchen). Der Cell-Dyn benötigt zur Messung lediglich 200 µl antikoaguliertes Vollblut und zählt das Blutbild durch Impedanzmessung in der Coulter-Zelle, den Hämoglobingehalt photometrisch und das Differentialblutbild anhand der Streulichtcharakteristiken der Zellen. Da in der vorliegenden Untersuchung heparinisiertes Vollblut zur Erstellung des Blutbildes verwandt wurde, blieb die Thrombozytenzahl aufgrund der Heparin-induzierten Aggregation der Thrombozyten unberücksichtigt. Die ermittelten Parameter wurden in eine Datenbank aufgenommen.

## 2.4 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Beim Durchflusszytometer (FACScan, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg) handelt es sich um ein opto-elektronisches Mess- und Analysegerät, das es ermöglicht, größere Zellzahlen anhand in- und extrazellulärer Merkmale zu untersuchen. Eine Zellsuspension wird mit monoklonalen Antikörpern versetzt, die sich an Oberflächenantigene binden. Die Antikörper wurden zuvor mit Farbstoffen chemisch gekoppelt (z. B. FITC, PE, PerCP, PE-Cy5), die Laserlicht einer definierten Wellenlänge absorbieren und es je nach Farbstoff in einer anderen, längeren wieder abstrahlen. Eine Färbung der Zellen mittels Farbstoffen, die in das Zellinnere diffundieren, ist ebenfalls möglich (siehe Abschnitt 2.10). Sowohl das abgestrahlte Lichtspektrum als auch das durch die Zelle gebrochene Laserlicht werden mittels Detektoren und Verstärkerketten (Photomultiplier-Röhren) aufgenommen und einem Computersystem zur Datenaufnahme und grafischen Darstellung zugeführt. Die Zellsuspension wird dazu im Gerät durch eine umhüllende Flüssigkeit (Sheath Fluid) so fokussiert, dass pro Zeiteinheit nur eine Zelle durch den Brennpunkt des Laserstrahles fließt. In diesem Moment nimmt der Computer die Daten dieser Zelle auf und speichert sie im Datensatz des Analysedurchganges (sogenanntes Listmode-File).

Pro Zelle werden - in Standardgeräten mit Analyse der Dreifarbenfluoreszenz - fünf Parameter (bei einem Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm) erfasst:

- Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter),
- Seitwärtsstreulicht (SSC, side scatter),
- Fluoreszenz 1 (FL1) mit Wellenlängen um 530 nm (Grünfluoreszenz),
- Fluoreszenz 2 (FL2) mit Wellenlängen um 580 nm (Orange fluoreszenz),
- Fluoreszenz 3 (FL3) mit Wellenlängen > 640 nm (Rotfluoreszenz).

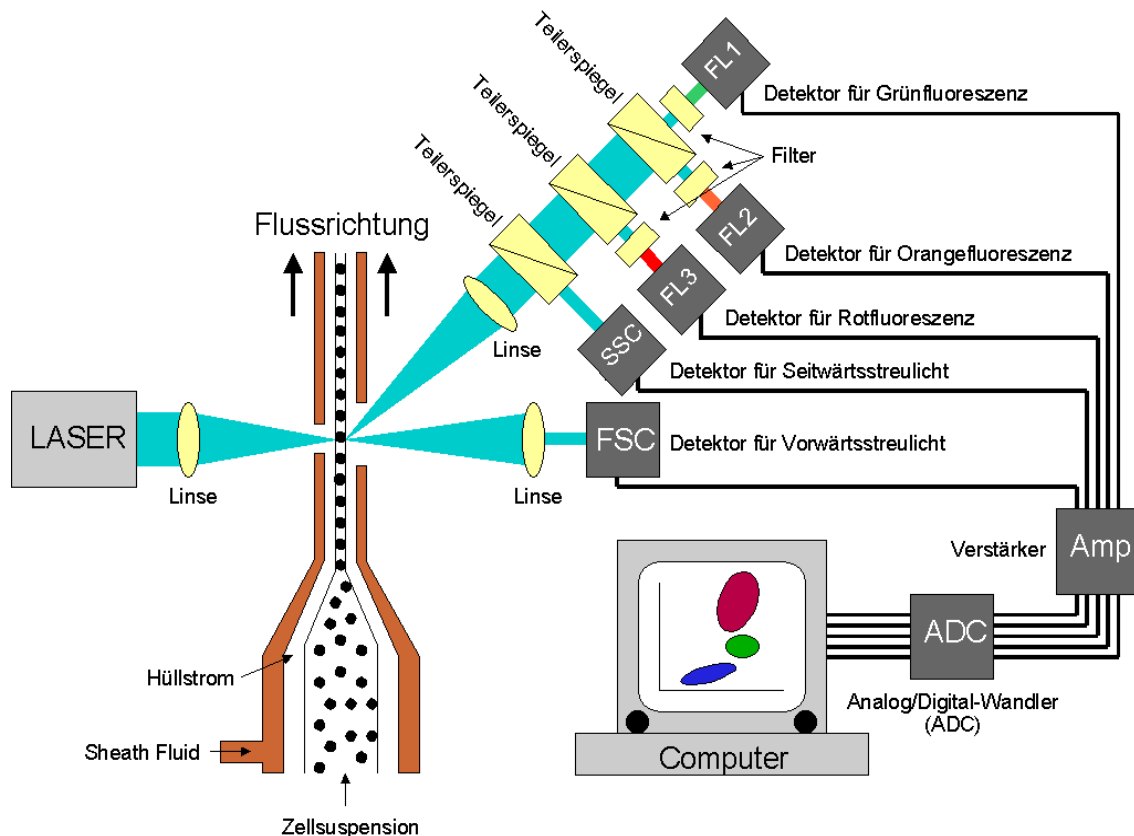


Abbildung 7: schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers

Im Vorwärtsstreulicht wird in einem Winkel von ca.  $3^\circ$  zur Strahlungsrichtung des Lasers die durch die Zelle gestreute Strahlung in der Wellenlänge des Lasers aufgenommen. Dies gilt als Maß für die Größe der Einzelzelle. Im Winkel von  $90^\circ$  werden Seitwärtsstreulicht (als Maß für die Granularität der Einzelzelle) und die drei Fluoreszenzen gemessen. Die Filter im  $90^\circ$ -Strahlengang dienen der Erzeugung einer Kaskade, die mit steigender Wellenlänge jeweils bestimmte Bereiche des Spektrums herausfiltert (bei FL3 als Tiefpassfilter, bei FL2 und FL1 als Bandpassfilter). Nach dem eigentlichen Detektor folgt noch eine lineare bzw. logarithmische Verstärkung, die die analogen Signale amplifiziert (im Schema oben als Verstärker - Amp dargestellt). Im Detektor werden die Signale empfangen und über einen eingebauten Analog/Digital-Wandler (ADC) in digitale Signale überführt, die im Listmode File gespeichert werden.

Zur grafischen Darstellung werden die digitalen Signale im ADC 256 oder 1024 sogenannte Kanäle klassifiziert, was den Speicheraufwand reduziert. Die Anzahl der Kanäle ist vom Untersucher wählbar. Zur multiparametrischen Untersuchung der Daten bietet sich die Darstellung in zweidimensionalen Dot-Plot-Matrizen an. Die Daten werden in einem Koordinatensystem aus Abszisse und Ordinate gezeigt. Jede Achse ist mit einem Parameter besetzt (z. B. FSC und SSC), ein Punkt entspricht einem Ereignis/einer Zelle. Bei dieser Form der Darstellung bilden sich charakteristische „Wolken“ aus Populationen gleichartiger Zellen. Durch Setzen einer „Region“ in der die Populationen eingegrenzt werden, erzeugt man logische Bedingungen („Gates“), die als Ein- bzw. Ausschlusskriterien für weitere Dot-Plots gelten können.



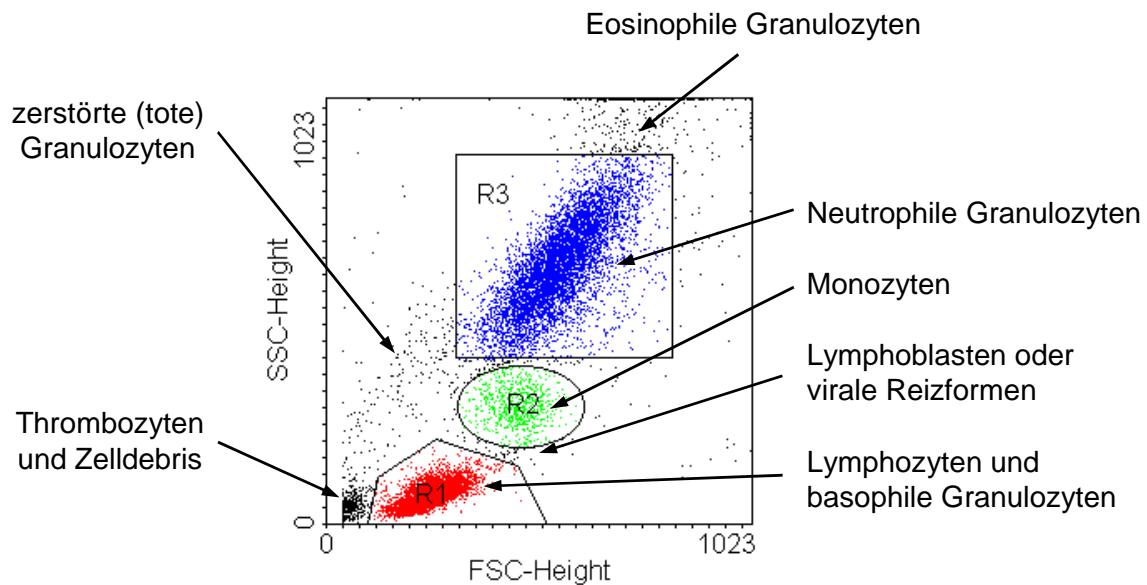


Abbildung 8: Beispiel für eine Dot-Plot-Matrix mit Regionen (R1-R3)

Möchte man die Häufigkeitsverteilung der Ereignisse innerhalb der Kanäle darstellen, kann man ein sogenanntes Histogramm erzeugen, das auf einer Achse die Anzahl an Ereignissen (Events) und auf der anderen die Kanäle einer bestimmten Fluoreszenz anzeigt (z. B. CD3-PerCP). Hier erfolgt die Darstellung entsprechend der Verstärkung logarithmisch. Mit Markern (hier M1) kann man den prozentualen Anteil von Ereignissen an der Gesamtzahl ermitteln, die von der Analysesoftware in einer separaten Statistik ausgegeben wird.

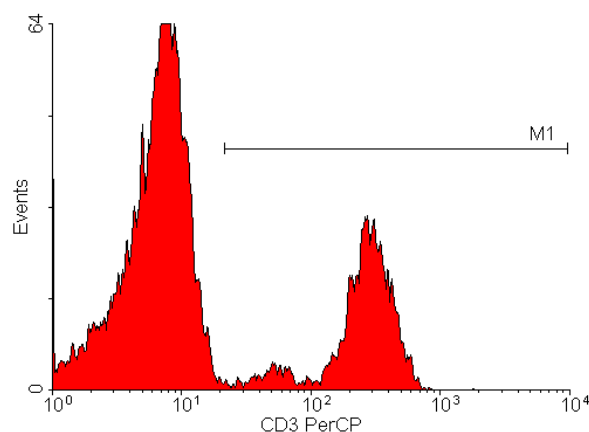


Abbildung 9: Beispiel für ein Histogramm mit Marker (M1)

Die Datenauswertung und initiale Datenaufnahme in der vorliegenden Untersuchung erfolgte mit der Software CellQuest™ (Version 1.2, Becton Dickinson, Heidelberg) im Durchflusssyztometer FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) unter MacOS 7.56 (Apple Computer Inc., München). Nachträgliche Auswertungen und grafische Darstellungen wurden mit Attractors 3.0™ (Becton Dickinson, Heidelberg), Paint-A-Gate PRO™ (Becton Dickinson, Heidelberg) ebenfalls unter MacOS und WinMDI 2.8 (Joseph Trotter, <http://facs.scripps.edu>) unter Microsoft Windows® 98 (Microsoft Corp., Seattle, Washington, USA) durchgeführt und erstellt.

Die Ausgabe üblicher statistischer Maßzahlen zu den jeweiligen Grafiken wie Mittelwert und Varianz sind in den oben genannten Analyseprogrammen einfach möglich.

Eine ausführliche Einführung in die Grundlagen der Durchflusszytometrie gibt (67).

## 2.5 Viruslastbestimmung mittels bDNA-Assay

Hierbei handelt es sich um einen Sandwich-Hybridisierungstest, der dem quantitativen Nachweis von viraler RNA dient (53). Die vom Patienten gewonnenen Blutproben werden zentrifugiert, um das HIV im Plasma anzureichern. Die Virus-Pellets werden sodann lysiert und mit freien Fangsonden (synthetische DNA-Oligonukleotide) an mit komplementären Fangsonden versehene Mikrotiterplatten gebunden. Die so gebundene RNA wird mit Zielsonden hybridisiert, die ihrerseits sogenannte Vorverstärkersonden binden. An diese Vorverstärkersonden lagern sich wiederum enzymmarkierte Verstärkersonden an, die, versetzt man sie mit einem passenden Substrat, Chemilumineszenz erzeugen. Durch die Verwendung von Mikrotiterplatten wird so eine ökonomische Analyse vieler Proben im Analyseautomaten ermöglicht, der die Chemilumineszenz misst, mit einer anhand von Referenzproben erstellten Eichkurve vergleicht und schließlich zum Messwert der RNA-Belastung der Probe gelangt.

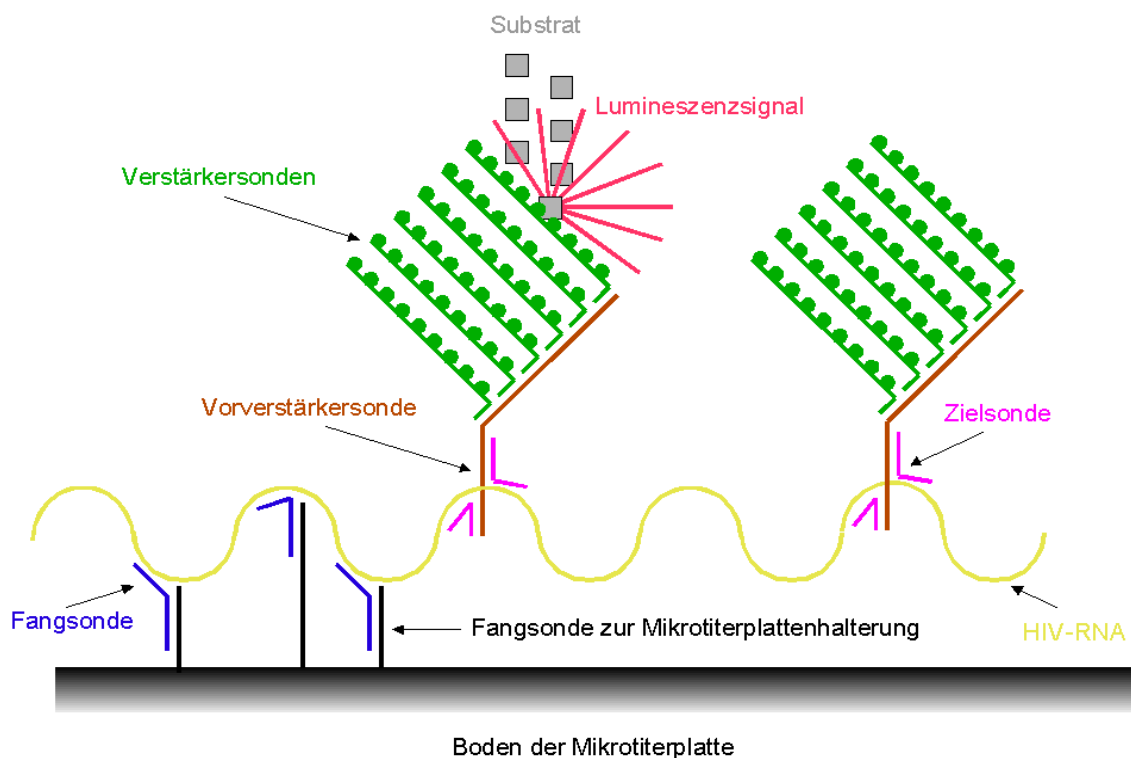


Abbildung 10: Prinzip der bDNA  
(nach der Anleitung zum VERSANT™ HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) der Fa. Bayer)

## 2.6 Immunphänotypisierung

Die Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen erfolgte mit dem Test-Kit Simultest™ IMK Plus (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 349217). Dieses Test-Kit ermöglicht in der Routinediagnostik die Quantifizierung von T-Lymphozyten, aktivierten T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) neben der immunologischen Differenzierung von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten. Die Reagenzien des Test-Kits wurden im Institut für Klinische Chemie mit PBS austitriert und auf Dreifarbenfluoreszenz erweitert. Die Werte der Patienten wurden in der Praxis Dres. Brust, Schuster, Queißer in analoger Weise im Routineprogramm bestimmt.

### 2.6.1 Material

- Simultest™ IMK Plus (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 349217):
  - Reagenz A: CD45-FITC, CD14-PE
  - Reagenz B: Isotyp-Kontrolle mit IgG<sub>1</sub>-FITC und IgG<sub>2a</sub>-PE
  - Reagenz C: CD3-FITC, CD19-PE
  - Reagenz D: CD4-FITC, CD8-PE
  - Reagenz E: CD3-FITC, HLA-DR-PE
  - Reagenz F: CD3-FITC, CD16/CD56-PE
  - Reagenz G: FACS-Lysing-Solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 349202), ist vor dem Gebrauch 1:10 in Aqua dest. zu verdünnen (Ampuwa für Spülzwecke, Fresenius Kabi, Bad Homburg) - zur Lyse der Erythrozyten und Fixierung der Leukozyten
- sterile Falcon 5 ml Polypropylenröhrchen mit rundem Boden (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 352053)
- unsterile Pipettenspitzen mit 100 µl Kapazität (Eppendorf AG, Hamburg, Best.-Nr. 0030003.004)
- 300 µl EDTA-Vollblut aus 2,7 ml Na-EDTA-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr. 05.1167)
- Cell Wash Waschpuffer (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 349524)
- fluoreszenzmarkierte Antikörper:
  - CD16-PE-Cy5 TRI-COLOR®-TC (Caltag Laboratories (International) GmbH, Hamburg, Best.-Nr. MHCD 1606)
  - CD45-PerCP (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 347464)
  - CD3-PerCP (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 347344)
- zerstoßenes Eis
- Styroporbehälter zur Kühlung der messfertigen Proben

## 2.6.2 Versuchsdurchführung

In 6 Polypropylenröhrchen wurden je 50 µl des EDTA-Blutes und je 20 µl der im folgenden dargestellten Antikörper pipettiert, mit einem Vortex-Mischer kurz gemischt und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

- Röhrchen 1: CD45-FITC, CD14-PE, CD16-PE-Cy5
- Röhrchen 2: IgG<sub>1</sub>-FITC, IgG<sub>2a</sub>-PE, CD45-PerCP
- Röhrchen 3: CD3-FITC, CD19-PE, CD45-PerCP
- Röhrchen 4: CD4-FITC, CD8-PE, CD3-PerCP
- Röhrchen 5: CD3-FITC, HLA-DR-PE, CD45-PerCP
- Röhrchen 6: CD3-FITC, CD16/CD56-PE, CD45-PerCP

Der Inkubationsphase folgten die Zugabe von 2 ml 1:10 verdünnter FACS-Lysing-Solution, gutes Durchmischen und eine weitere zehnminütige Inkubation. Dies lysierte die noch vorhandenen Erythrozyten und bewirkte eine Fixierung der Leukozyten. Anschließend wurde der Ansatz bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert, dann dekantiert und mit 2,5 ml Cell Wash versetzt. Nach einem erneuten Waschschrift bei 300 g für 5 Minuten in der Zentrifuge und Dekantieren des Überstandes wurden die Proben bis zur Analyse im Durchflusszytometer dunkel auf Eis gelagert.

## 2.6.3 Durchflusszytometrische Analyse

Nach kurzem Mischen im Vortex-Mischer wurden die gefärbten Ansätze im Durchflusszytometer mit CellQuest™ analysiert. Das Setzen der Gates und Quadranten erfolgte anhand der Probe der jeweiligen gesunden Kontrollperson des Tages, die als Positivkontrolle diente, als Negativkontrolle diente Röhrchen 2 mit den Isotypkontrollen der verwandten Antikörper-Subklassen (reaktiv auf ein beim Menschen nicht exprimiertes Antigen von Lochschnecken: keyhole limpet hemocyanin - KLH). Nach der Analyse aller Röhrchen können Absolutzahl und prozentuale Werte der folgenden Leukozytenpopulationen berechnet werden:

- Lymphozyten.....CD45+, SSC-
  - T-Lymphozyten.....CD3+
    - T-Helferzellen.....CD3+, CD4+
    - zytotoxische T-Zellen .....CD3+, CD8+
    - aktivierte T-Lymphozyten ...CD3+, HLA-DR+
  - B-Lymphozyten.....CD19+
  - NK-Lymphozyten.....CD16+, CD56+, CD3-
- Monozyten.....CD14+
- neutrophile Granulozyten.....CD45+, CD16+
- eosinophile Granulozyten.....CD45+, CD16-
- basophile Granulozyten.....CD45(+), SSC-

Die ermittelten Messwerte für CD4+ Zellen wurden in die Datenbank zum Patienten aufgenommen.

## 2.7 Antikörperbeladung der Zellen

Zur Messung der Autoantikörperbeladung der Zellen erfolgte die Detektion der Autoantikörper auf Lymphozyten mittels eines gegen humanes IgG gerichteten, PE-markierten, monoklonalen Antikörpers vom Esel. Das Prinzip dieser Anfärbung zeigt die folgende Abbildung:

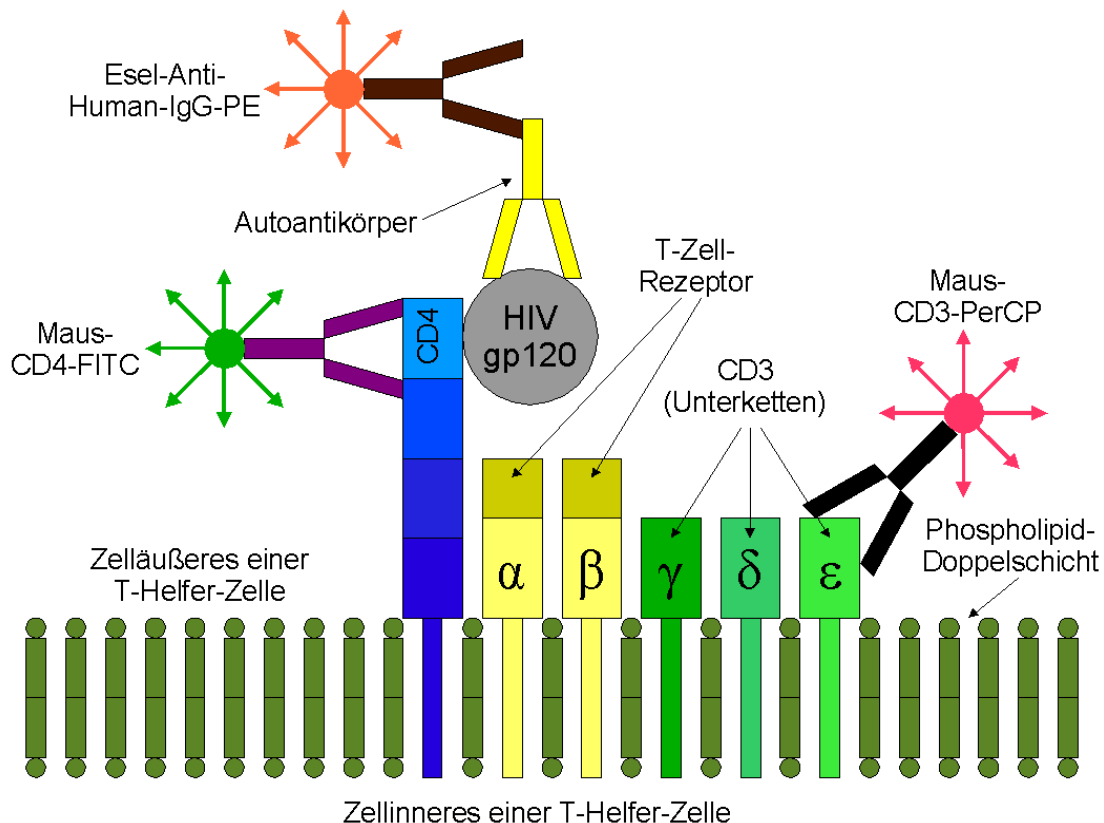


Abbildung 11: Nachweis von Autoantikörpern auf T-Helferzellen

Die humanen Antikörper gegen lymphozytäre Oberflächenstrukturen wurden durch diesen Antikörper indirekt gefärbt, die T-Lymphozyten selbst mit CD3-PerCP-Antikörpern und die Subpopulation der Helferzellen mit CD4-FITC-markierten Antikörpern.

### 2.7.1 Material

Folgende Materialien wurden benötigt:

- 100 µl Heparin-Vollblut aus 10 ml NH<sub>4</sub>-Heparin-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr. 02.1064)
- sterile Falcon 5 ml Polypropylenröhrchen mit rundem Boden (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 352053)
- unsterile Pipettenspitzen mit 1000 µl, 100 µl und 20 µl Kapazität (Eppendorf AG, Hamburg, Best.-Nr. 0030015.002, Best.-Nr. 0030003.004 und Best.-Nr. 0030001.168)
- Cell Wash Waschpuffer (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 349524)
- Donkey-Serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Best.-Nr. D 9663)
- fluoreszenzmarkierte Antikörper:
  - CD4-FITC (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 340133)

- Anti-Human-IgG-PE (Jackson Immuno Research Laboratories Inc., West Grove, PA, USA, Best.-Nr. 709-116-149)
- CD3-PerCP (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 347344)
- Erythrozyten-Lyselösung FACS-Lysing-Solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 349202), ist vor dem Gebrauch 1:10 mit Aqua dest. zu verdünnen (Ampuwa für Spülzwecke, Fresenius Kabi, Bad Homburg)
- zerstoßenes Eis
- Styroporbehälter zur Kühlung der messfertigen Proben

## 2.7.2 Versuchsdurchführung

100 µl des heparinisierten Blutes wurden in ein 5 ml Polypropylenröhrchen gegeben, mit 2,5 ml Cell Wash versetzt, mit dem Vortex-Mischer gut durchgemischt und in der Zentrifuge bei 300 g für 5 Minuten gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert, dieser Waschschrift noch zwei weitere Male wiederholt. Dies eliminierte lösliche Antikörper aus dem Ansatz. Es folgte die Absättigung unspezifischer Bindung mit 10 µl Donkey-Serum und Durchmischen. Sodann wurden je 20 µl CD4-FITC (1:2 in PBS verdünnt), Anti-Human-IgG-PE (1:25 verdünnt) und CD3-PerCP (1:4 verdünnt) zugegeben. Nach erneutem Mischen wurde der Ansatz für 15 Minuten dunkel inkubiert. Der Inkubationsphase folgten die Zugabe von 2 ml 1:10 verdünnter FACS-Lysing-Solution, gutes Durchmischen und eine weitere zehnminütige Inkubation. Dies lysierte die noch vorhandenen Erythrozyten und bewirkte eine Fixierung der Leukozyten. Abschließend wurde der Ansatz nochmals bei 300 g für 5 Minuten mit 2,5 ml Cell Wash gewaschen, dekantiert und bis zur Analyse im Durchflusszytometer dunkel auf Eis gelagert.

## 2.7.3 Durchflusszytometrische Analyse

Zur Analyse wurden 10000 Lymphozyten ins Listmode-File aufgenommen. Im FSC/SSC-Dot-Plot (siehe Abbildung 8, Seite 25) wurde eine erste Region um die Lymphozytenpopulation gelegt (R1), durch die ein logisches Gate (G1) für die folgende SSC/FL3-Dot-Plot-Darstellung gesetzt wurde. Um die in dieser Darstellung CD3-positiven Zellen wurde eine weitere Region (R2) und ebenfalls ein logisches Gate (G2) gesetzt, so dass in der abschließenden FL1/FL2-Dot-Plot-Grafik nur T-Zellen zur Darstellung kommen:

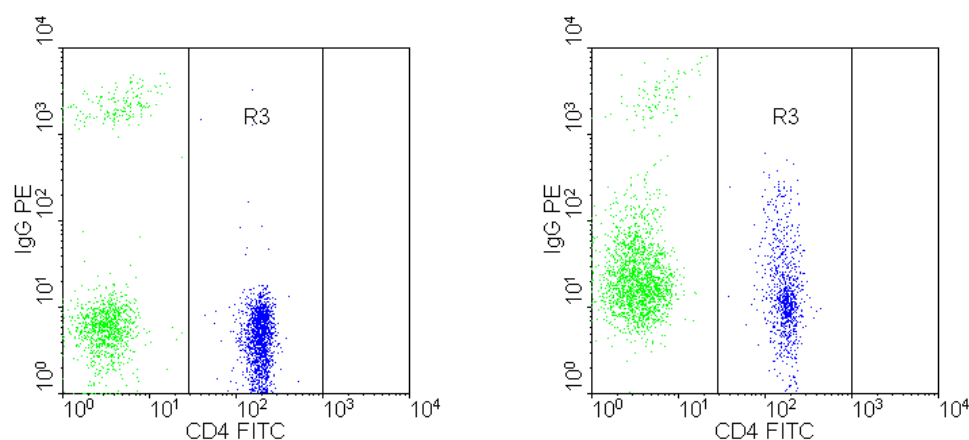


Abbildung 12: Messung der IgG-Beladung im Durchflusszytometer (links der Dot-Plot einer gesunden Kontrollperson, rechts der eines HIV-infizierten Patienten mit deutlich höherer IgG-Beladung der CD4+ Zellen in der Region R3)

In diesem Dot-Plot lässt sich die Fraktion der CD4-positiven (T-Helferzellen) und gleichzeitig IgG-positiven, damit durch Autoantikörper beladenen Zellen in einer Region abgrenzen. Der Mittelwert der Orange fluoreszenz (FL2) der in der Region 3 vorhandenen Zellen stellt ein Maß für die Autoantikörperbeladung dar. Das Setzen der Regionen erfolgte an der als Negativkontrolle mitlaufenden Probe des Kontrollprobanden des jeweiligen Versuchstages.

In die Datenbank wurde der Mittelwert der Fluoreszenz 2 der Autoantikörper-positiven T-Helferzellen aufgenommen.

## 2.8 Phagozytose von Lymphozyten durch Makrophagen

Die Messung von Phagozytose und Apoptose der Lymphozyten erfolgte ausgehend von einem gemeinsamen präparativen Vorlauf, der im Folgenden dargestellt wird. Bis zur Färbung der Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper war die Behandlung gleich und wird daher nur einmal dargestellt.

Kern dieses Assays ist die Verwendung von speziellen Gewebekulturplatten, die durch ihre Oberflächenbeschaffenheit eine Adhärenz und Aktivierung der Monozyten zu Makrophagen bewirken sollen. Hierbei handelt es sich um Cellstar® Gewebekulturplatten mit 6 Vertiefungen und Deckel (einzeln verpackt, No. 657160 der Firma Greiner Labortechnik, Nürtingen). Die in diesen Gewebekulturplatten acht Stunden lang inkubierten Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten wurden nach Entnahme gefärbt und im Durchflusszytometer auf den prozentualen Anteil an Phagozytose und Apoptose untersucht. Als Modell zur Opsonierung der Lymphozyten in vitro und als Positivkontrolle wurde das Immunsuppressivum ATG, ein polyclonales, gegen humane T-Lymphozyten gerichtetes Immunglobulin vom Kaninchen eingesetzt. Dieses Präparat dient primär der Therapie einer akuten Abstoßungsreaktion bei Organtransplantationen mittels Immunsuppression durch T-Zell-Depletion (13).

Die Färbung der Makrophagen erfolgte mit PE-markierten CD14-Antikörpern, die Lymphozyten wurden mit CD3-FITC und CD8-PerCP angefärbt. Die Permeabilisation der Zellen zur intrazellulären Färbung gelang mittels eines kommerziellen Test-Kits (Fix und Perm-Kit, An der Grub Bio Research GmbH, Kammberg, Österreich). Das Prinzip der Färbung zeigt die folgende Abbildung:

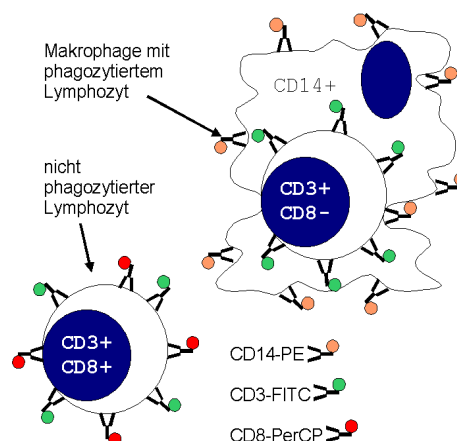


Abbildung 13: Färbung der Phagozytose

Die noch auf den Böden der Gewebekulturplatten haftenden Zellen wurden fixiert und nach Pappenheim gefärbt. Die Böden wurden sodann mittels Spezialwerkzeug herausgetrennt und unter dem Mikroskop auf Phagozytose hin manuell ausgezählt.

Die Feinmechanische Werkstatt des Klinikums Mannheim stellte einen Bohrer her, der es ermöglichte, die Bodenflächen der Gewebekulturplatten mit geringstem Verlust an Material herauszutrennen, ohne den spröden Kunststoff der Platten zu zerbrechen. Eingespannt in eine handelsübliche Standbohrmaschine war so ein zügiges und materialschonendes Arbeiten mit dem folgendermaßen aufgebauten Bohrer möglich:

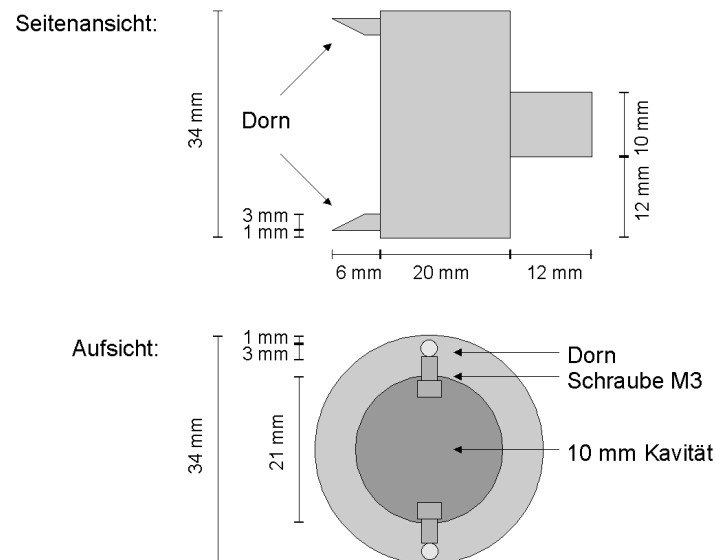


Abbildung 14: Bohrer zur Entfernung der Böden der Gewebekulturplatten

Zur optischen Auswertung unter dem Mikroskop wurde eine spezielle Haltevorrichtung aus Kunststoff angefertigt, da sich zeigte, dass die runden Böden der Ausbuchtungen der Kulturplatten nicht in herkömmliche Haltevorrichtungen für Objektträger passen, bzw. sich aus diesen nach kurzer Zeit lösen und durch die Spannfeder vom Objektisch geschleudert werden.

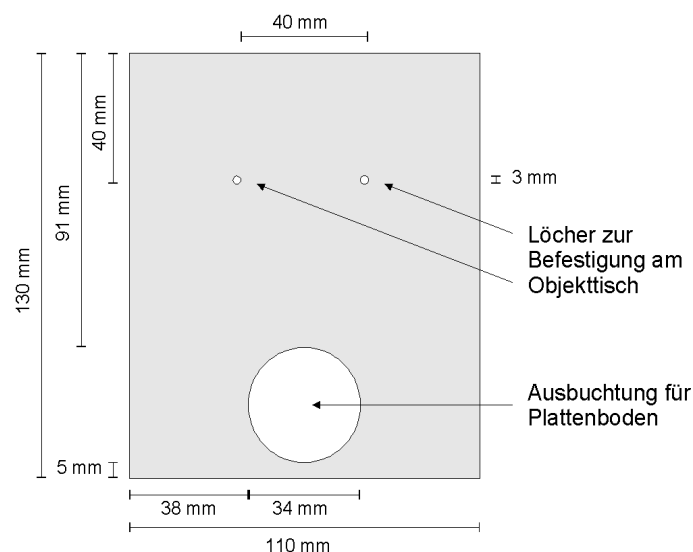


Abbildung 15: Haltevorrichtung für Böden der Gewebekulturplatten



Die Durchführung des Assays benötigte - rein für den Phagozytose- und Apoptoseanteil - bei einer als Mittelwert angenommenen Zahl von vier Proben (drei Patienten und eine Kontrollperson) ca. 15 Stunden, bedingt durch die lange Inkubationsphase: ca. zwei Stunden für den präparativen Vorlauf, acht Stunden Inkubation und ca. fünf Stunden für weitere Präparation und Analyse im Durchflusszytometer. Die zusätzlich durchgeführten weiterführenden Untersuchungen erhöhten den zeitlichen Aufwand um nochmals jeweils ca. zwei Stunden, die Viruslastbestimmung mittels bDNA nicht eingerechnet. Diese wurde extern durchgeführt.

## 2.8.1 Material

Folgende Materialien wurden benötigt:

- 5 ml Heparin-Vollblut aus 10 ml NH<sub>4</sub>-Heparin-Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr. 02.1064)
- sterile Falcon BlueMax™ Jr. 15 ml Polypropylenröhrchen mit konischem Boden (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 352096)
- sterile PBS-Dulbecco-Lösung w/o Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> (Biochrom KG, Berlin, Best.-Nr. L1825)
- sterile Biocoll Separating Solution (Biochrom KG, Berlin, Best.-Nr. L6113)
- sterile Falcon 5 ml Polypropylenröhrchen mit rundem Boden (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 352053)
- sterile 3,5 ml Transfer-Pipetten (Sarstedt, Nümbrecht, Best.-Nr. 86.1171.001)
- sterile 5 ml, 10 ml und 25 ml serologische Pipetten (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 357543, Best.-Nr. 357551 und Best.-Nr. 357525)
- sterile Einmal-Pipettenspitzen mit 1000 µl und 100 µl Kapazität (Eppendorf AG, Hamburg, Best.-Nr. 0030001.311 und Best.-Nr. 0030001.303)
- unsterile Pipettenspitzen mit 1000 µl, 100 µl und 20 µl Kapazität (Eppendorf AG, Hamburg, Best.-Nr. 0030015.002, Best.-Nr. 0030003.004 und Best.-Nr. 0030001.168)
- sterile Cellstar® Gewebekulturplatten mit sechs Ausbuchtungen (Greiner Labortechnik, Nürtingen, Best.-Nr. 657160), je eine Platte für 2 Proben
- ATG-Fresenius (Fresenius AG, Bad Homburg)
- zerstoßenes Eis
- fluoreszenzmarkierte Antikörper:
  - CD3-FITC (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 345763)
  - CD14-PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 345785)
  - CD8-PerCP (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 345774)
- Fix & Perm Cell Permeabilization Kit (An der Grub Bio Research GmbH, Kammberg, Österreich, Best.-Nr. GAS-002)
- Cell Wash Waschpuffer (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 349524)
- Maus-Serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Best.-Nr. M 5905)
- Methanol (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.06009.1000)
- May-Grünwald-Lösung (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.01424.0500)
- Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt, Best.-Nr. 1.09204.0500)
- Immersionsöl ohne Eigenfluoreszenz gem. DIN 58884/ISO 8036/1 (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Best.-Nr. 11513859)
- Zellstofftupfer Lohmann Zelletten 5\*4 cm (Lohmann GmbH & Co. KG, Neuwied, Best.-Nr. 13356)
- Diahüllen (HAMA, Monheim, Best.-Nr. 2004)
- Styroporbehälter zur Kühlung der messfertigen Proben

## 2.8.2 Versuchsdurchführung

Die Durchführung erfolgte unter sterilen Kautelen in einer Sterilbank, zum Mischen wurde bis zur achtstündigen Inkubation auf mechanische Hilfsmittel (Vortex-Mischer) gänzlich verzichtet.

Von jeder Blutprobe aus den Heparin-Monovetten wurden 5 ml nach kurzem Schwenken mittels einer serologischen Pipette entnommen und 1:2 in 5 ml zimmerwarmer PBS-Lösung verdünnt. Nach weiterem Schwenken wurden 5 ml raumwarme Biocoll Separating Solution in einem 15 ml Falcon-Röhrchen vorsichtig mit den soeben hergestellten 10 ml in PBS verdünntem Blut überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur mit 700 g für 20 Minuten ohne Bremse. Nun wurde die oberste Schicht, die Serum und PBS enthielt, vorsichtig mittels einer Transferpipette abgehoben und in ein frisches 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Die Fraktion der mononukleären Zellen wurde ebenfalls vorsichtig mittels Transferpipette geborgen und in einem weiteren 15 ml Falcon-Röhrchen mit 10 ml raumwarmer PBS versetzt und durchmischt. Serum und PBS wurden bei 700 g für 10 Minuten zentrifugiert, um die Thrombozyten abzutrennen; die mononukleären Zellen wurden für 10 Minuten bei 100 g in der Zentrifuge ohne Bremse gewaschen. Aus dem Falcon-Röhrchen mit den Zellen wurde die PBS-Lösung bis kurz vor dem Zell-Pellet abgehoben und verworfen, die Zellen mit mindestens 3 ml des Serum/PBS-Gemisches resuspendiert, so dass die Zellzahl  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml betrug. Diese wurde im Hämatologieanalyseautomaten Cell-Dyn CD 3500 (Abbott GmbH, Wiesbaden) überprüft.

In jede Ausbuchtung (1-3) der Gewebekulturplatten wurden jeweils 1 ml der Zellsuspension (entsprechend  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml) und je 1 ml des Serum/PBS-Gemisches pipettiert. In die Ausbuchtungen 2 und 3 wurden noch 20 µl ATG (1:400 mit PBS verdünnt) gegeben. Nach kurzem Durchmischen mit den sterilen Einmal-Pipettenspitzen wurden die Kulturplatten mit den mitgelieferten Deckeln verschlossen und bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37° C für 8 Stunden in einen Inkubator gegeben. Die Ausbuchtungen 4 bis 6 der Gewebekulturplatten wurden analog zu den Ausbuchtungen 1 bis 3 für eine weitere Probe verwandt.

Nach der Inkubationsphase wurden die Kulturplatten vorsichtig - ohne sie übermäßig zu erschüttern - entnommen und mittels inversem Mikroskop orientierend auf Verunreinigungen und bakterielle Kontamination überprüft. Aus der Ausbuchtung 3 wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Die Platten wurden sodann für 15 Minuten dunkel auf zerstoßenes Eis gestellt. Es folgte die Entnahme des Überstandes der Ausbuchtungen 1 und 2 nach leichtem Durchmischen mit der Pipettenspitze und Überführung in die Falcon 5 ml Polypropylenröhrchen mit rundem Boden, die analog der Ausbuchtungen mit 001 und 002 beschriftet wurden. Es wurden noch einmal je 2 ml PBS in die beiden Ausbuchtungen gegeben, wieder nach leichtem Mischen abpipettiert und in die passenden Falcon-Röhrchen gegeben, um möglichst viele Zellen aus den Ausbuchtungen zu gewinnen. Vom Inhalt der Röhrchen 001 und 002 wurde nun die Hälfte entnommen und in neue Falcon-Röhrchen mit den Nummern 003 und 004 gegeben (001 in 003 und 002 in 004). Die Röhrchen 003 und 004 wurden für die **Messung der Apoptose** verwandt, deren weitere Aufarbeitung wird im Abschnitt 2.10 beschrieben. Nach Zentrifugation bei 300 g für 5 Minuten und Dekantieren des Überstandes wurden 20 µl CD14-PE (1:2 in PBS verdünnt) zugegeben, gemischt mit Vortex-Mischer und für 15 Minuten dunkel inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 100 µl der Reagenz A des Fix und Perm-Kits, kurzes Mischen und die weitere dunkle Inkubation für 15 Minuten. Es schloss sich ein Waschschritt durch Zugabe von 2,5 ml Cell Wash, Zentrifugation bei 300 g für 5 Minuten und Dekantieren des Überstandes an. Nun wurden 200 µl Reagenz B zugegeben, mit 10 µl Maus-Serum abgesättigt, je 20 µl CD3-FITC und 20 µl CD8-PerCP zugegeben (jeweils 1:2 in

PBS verdünnt). Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 2,5 ml Cell Wash, 5 Minuten Zentrifugation bei 300 g und Dekantieren. Die so vorbereiteten Proben wurden dunkel auf zerstoßenes Eis gestellt und konnten nach kurzem Mischen im Durchflusszytometer analysiert werden.

Die Böden der Gewebekulturplatten wurden durch Zugabe von 1 ml Methanol für 5 Minuten fixiert und danach mit May-Grünwald und Giemsa-Lösung nach Pappenheim gefärbt. Nach dem Trocknen der Böden wurden diese mit dem oben beschriebenen Bohrer entnommen und in der gezeigten Vorrichtung unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Verwendung des oben genannten Immersionsöles der Firma Leica erwies sich als besonders schonend für den Kunststoff der Platten, da andere Öle die Plättchen angriffen.

### 2.8.3 Durchflusszytometrische Analyse

Insgesamt wurden pro untersuchter Probe 80000 Ereignisse aufgenommen. Die Datenaufnahme während der Messung im Durchflusszytometer erfolgte mit CellQuest™, die Auswertung der Listmode-Dateien wurde mit Attractors 3.0™ durchgeführt. Die folgende Abbildung soll die Analyse verdeutlichen:

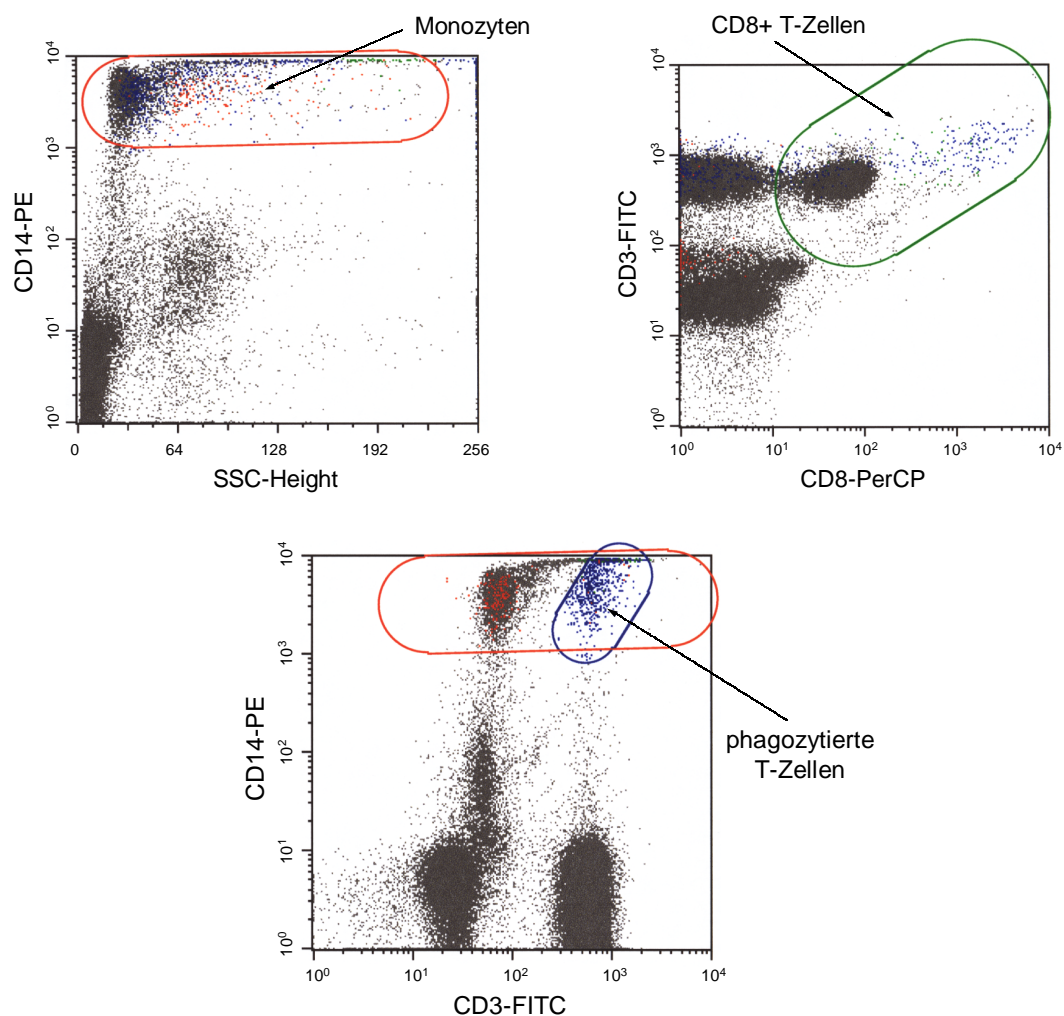


Abbildung 16: Auswertung der Phagozytosemessung im Durchflusszytometer unter Attractors 3.0™

Im SSC/FL2-Dot-Plot (links oben) wurde ein Gate um die Monozyten/Makrophagen-Population (CD14+) gelegt (roter Kreis) und so die Gesamtzahl der CD14+ Zellen der Probe bestimmt. Von den CD14-positiven Zellen wurde im folgenden (oberen rechten) Streudiagramm die Fluoreszenz der gleichzeitig CD3-positiven und CD8-positiven Zellen dargestellt (grüner Kreis), um zu berechnen, welcher Prozentsatz der CD14-positiven Zellen intrazellulär Lymphozytenmarker für zytotoxische T-Zellen aufwies (phagozytierte CD8+ Zellen). Das untere Streudiagramm zeigt die Bestimmung des Anteils phagozytierter Lymphozyten allgemein, hier sind die CD3+ und gleichzeitig CD14+ Zellen blau eingefärbt. Dieser Prozentwert entsprach dem Anteil an Makrophagen, die einen Lymphozyten phagozytiert hatten. Der Prozentsatz an phagozytierten CD4+ Zellen (Helferzellen) wurde rechnerisch als Anteil der gleichzeitig CD14+ und CD3+/CD8- Zellen bestimmt. Der geringe Anteil an doppelt negativen T-Zellen, der diese Rechnung beeinflusst, wurde vernachlässigt.

In die Datenbank wurden der prozentuale Anteil von Makrophagen phagozytierter Lymphozyten (CD14+/CD3+), phagozytierter zytotoxischer T-Zellen (CD14+/CD3+/CD8+) und T-Helferzellen (CD14+/CD3+/CD8-) übernommen. Durch die parallelen Ansätze mit und ohne ATG ließ sich die Stimulierung der Phagozytose durch Immunglobulinbeladung an der Oberfläche der Zellen als Modell und Positivkontrolle ebenfalls ermitteln.

Das Setzen der Regionen und Marker erfolgte an jedem Versuchstag neu an den Proben des als Negativkontrolle mitgeführten Kontrollpatienten. Die an diesen Proben von Gesunden festgestellten Phagozytoseraten können analog zur mikroskopischen Auszählung als basale Phagozytoserate verstanden werden.

## 2.8.4 Mikroskopische Auswertung

Die Bodenplatten wurden nach dem Ausschneiden mit dem Bohrer von einer Hilfsperson mit einem vom Untersucher nicht nachvollziehbaren Zahlencode gekennzeichnet (geblindet) und unter einem Immersionsmikroskop mit 1000-facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurde der prozentuale Anteil der Makrophagen, die einen Lymphozyten phagozytiert hatten, bestimmt. Dazu wurden die Platten mäanderförmig durchmustert, 100 Makrophagen durchgezählt und der Anteil der Makrophagen, die einen Lymphozyten phagozytiert hatten, als Phagozytoserate bezeichnet. Dies erfolgte bei der Platte der Ausbuchtung 1 als basale Phagozytoserate des Probanden, die Platte 2 stellte die Phagozytoserate unter Stimulation mit ATG dar. Die Platte 3, die im Phagozytoseansatz mit ATG versehen war, von der aber keine Zellen für die durchflusszytometrische Analyse entnommen wurden, wurde zum Vergleich mitbestimmt, da die Zelldichte auf den Platten 1 und 2 um den Faktor 10 geringer war. Die Phagozytoseraten auf den drei Platten wurden nach der Entblindung der Ergebnisse in die Datenbank zum Patienten aufgenommen. Pro Platte dauerte die Auswertung durchschnittlich 25 Minuten.

Zur dauerhaften Lagerung der Platten wurden diese nach vorsichtigem Abwischen des Immersionsöles mit einem Zellstofftupfer und Einschlagen in einen weiteren Tupfer in handelsüblichen Foto-Diahüllen asserviert.

Die folgende Abbildung zeigt die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der beginnenden Phagozytose eines Lymphozyten (grün) durch einen Makrophagen (orange) bei 1000-facher Vergrößerung. Die Fotografie stammt aus dem Ausstrich der Probe einer unter 2.8.2 hergestellten Färbung für das Durchflusszytometer.



Abbildung 17: Beginnende Phagozytose im Fluoreszenzmikroskop  
(Makrophage orange, Lymphozyt grün angefärbt)

## 2.9 Viruslastbestimmung

Die Bestimmung der Viruslast erfolgte mit dem VERSANT™ HIV-1 RNA 3.0 Assay (bDNA) der Firma Bayer Vital GmbH (Fernwald, Best.-Nr. 118276) im Labor Dr. Jäger in München. Dieser Test ist für die Verwendung bei mit HIV-1 Gruppe M infizierten Patienten vorgesehen. Er weist nach Konzentrierung von HIV-1 aus dem Plasma der Infizierten die Anzahl an Kopien der HIV-RNA in der Probe nach, die Nachweisgrenze liegt bei 50 Kopien pro ml.

Die ermittelten Viruslasten der Patienten wurden in die Datenbank übernommen. Aus statistischen Gründen wurde bei Patienten, deren Viruslast unter der Nachweisgrenze lag, der Wert auf 1 gesetzt.

## 2.10 Apoptose von Lymphozyten

Dieser Test ermöglicht die Färbung apoptotischer Zellen mittels des mit fluoreszentem Farbstoff FLUOS markierten Liganden Annexin (Detektion von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite apoptotischer Zellen, dargestellt in FL1) und die durchflusszytometrische Analyse (97). Er schließt vom präparativen Aufwand an den Phagozytostest (siehe 2.8.2) an, daher wird hier nur das benötigte Material für die Aufbereitung nach der achtstündigen Inkubation dargestellt. Die immunologische Färbung der Lymphozyten erfolgte mit CD4-PE oder CD8-PE in FL2, um die Lymphozytensubpopulationen getrennt zu analysieren. Tote Zellen wurden mit dem DNA-Farbstoff 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) in der dritten Fluoreszenz angefärbt. Dieser polare Farbstoff kann nur in avitale Zellen ohne intakte Membranen eindringen und färbt deren Zellkerne rot.

### 2.10.1 Material

Folgende Materialien wurden verwandt:

- sterile Falcon 5 ml Polypropylenröhrchen mit rundem Boden (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 352053)
- Cell Wash Waschpuffer (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 349524)
- unsterile Pipettenspitzen mit 1000 µl, 100 µl und 20 µl Kapazität (Eppendorf AG, Hamburg, Best.-Nr. 0030015.002, Best.-Nr. 0030003.004 und Best.-Nr. 0030001.168)
- zerstoßenes Eis
- fluoreszenzmarkierte Antikörper:
  - CD4-PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 347327)
  - CD8-PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Best.-Nr. 340046)
- Apoptosepuffer (sterilfiltriert, à 2 ml aliquotiert, bei 4° C gelagert):
  - 10 mM HEPES in NaOH bei pH 7,4 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Best.-Nr. H 3375 und Best.-Nr. S 8045)
  - 140 mM NaCl (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Best.-Nr. S 7653)
  - 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Best.-Nr. C 5080)
- 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande, Best.-Nr. A-1310)
- Annexin-V-Fluos (Boehringer Mannheim, Mannheim, Best.-Nr. 1828681)
- Styroporbehälter zur Kühlung der messfertigen Proben

### 2.10.2 Versuchsdurchführung

Der Inhalt der im **Phagozytostest** hergestellten Röhrchen 003 und 004 (siehe 2.8.2) wurde erneut halbiert, die Hälfte in neue Röhrchen mit der Bezeichnung 005 und 006 überführt (003 in 005 und 004 in 006). Es folgte ein Waschschrift mit 2,5 ml Cell Wash bei 300 g und für 5 Minuten in der Zentrifuge. Der Überstand wurde dekantiert, Röhrchen 003 und 004 erhielten je 20 µl CD4-PE (1:4 mit PBS verdünnt), Röhrchen 005 und 006 je 20 µl CD8-PE. Nach Mischen im Vortex-Mischer wurde für 15 Minuten dunkel inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Färbelösung für die eigentliche Apoptosefärbung vorbereitet: 500 µl Apoptosepuffer wurden mit 1 µl 7-AAD und 10 µl Annexin-V gemischt. Die mit den Antikörpern markierten Zellen wurden mit 2,5 ml Cell Wash bei 300 g für 5 Minuten in der Zentrifuge gewaschen und der Überstand dekantiert.

Alle Röhrchen (003 bis 006) wurden dann mit je 50 µl der Färbelösung versehen, kurz gemischt und für 10 Minuten dunkel inkubiert. Die Proben wurden bis zur Analyse auf zerstoßenem Eis gelagert und sobald als möglich nach kurzem Aufmischen im Durchflusszytometer analysiert.

### 2.10.3 Durchflusszytometrische Analyse

Pro Listmode-File wurden in CellQuest™ so viele Zellen gespeichert, dass in einer um die CD4-positiven Ereignisse gelegten Region (R1) 2000 Zellen aufgenommen wurden (im FL2/FSC-Dot-Plot). Nur diese Zellen gelangten durch ein mit R1 verbundenes logisches Gate G1 in die Auswertung im FL1/FL3-Dot-Plot. Dort wurden sowohl eine Quadrantenstatistik als auch zwei Regionen (R2 und R3) angelegt. Der linke untere Quadrant enthielt die Ereignisse, die negativ bezüglich Annexin und 7-AAD waren, also lebende, nicht apoptotische Zellen. Die beiden oberen Quadranten enthielten Zellen, die sich stark mit 7-AAD haben anfärben lassen und somit als tot gewertet wurden. Der rechte untere Quadrant enthielt Zellen, deren Phosphatidylserin auf der Oberfläche durch Annexin angefärbt wurde, sie galten als apoptotisch. Zur genaueren Erfassung der Apoptose wurde dieser Quadrant durch die beiden Regionen R2 und R3 weiter unterteilt, Ereignisse in Region 3 galten als früh apoptotisch, die in Region 2 als spät apoptotisch.

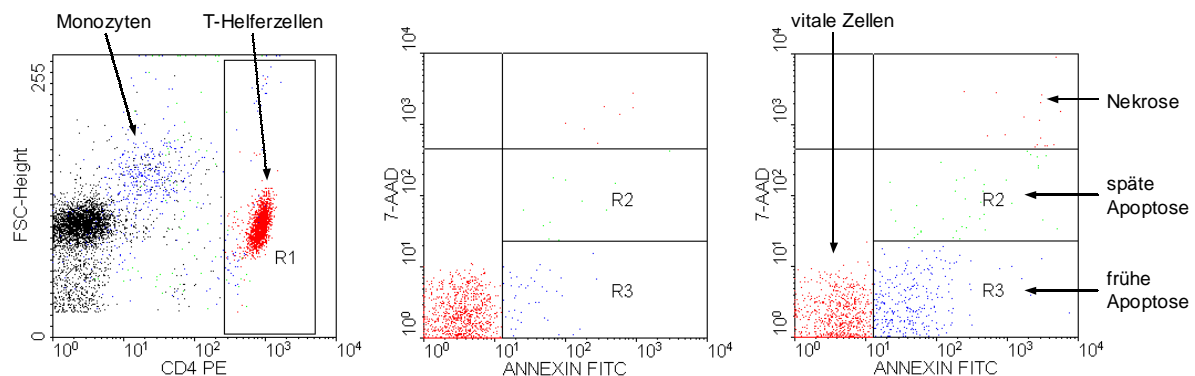


Abbildung 18: Darstellung der Anfärbung der Apoptose bei T-Helferzellen

Der linke Dot-Plot der obigen Abbildung 18 zeigt das Setzen der Region um die CD4+ Zellen in der FL2/FSC-Darstellung. Der mittlere Dot-Plot demonstriert die Messung der Apoptose bei einem gesunden Kontrollprobanden, der rechte zeigt das Ergebnis eines HIV-positiven Patienten mit erhöhter Apoptoserate der T-Helferzellen (relativ mehr Zellen in den Regionen R2 und R3).

Die Messung der Apoptose bei CD8-positiven Zellen erfolgte, wie oben bei den CD4-positiven Zellen beschrieben, durch Setzen einer Region bzw. eines Gates um die CD8+ Zellen im FL2/FSC-Dot-Plot und nachfolgende Darstellung der Färbung mit Annexin/7-AAD.

Zur Bestimmung der Apoptoserate der Monozyten wurde im FL1/FSC-Dot-Plot eine Region bzw. ein Gate um die schwach CD4-positive Monozytenpopulation gelegt, was als Bedingung für den folgenden FL1/FL3-Dot-Plot galt. Die Auftrennung in früh-/spätapoptotische Zellen und tote Zellen erfolgte analog der Bestimmung bei CD4-positiven Zellen.

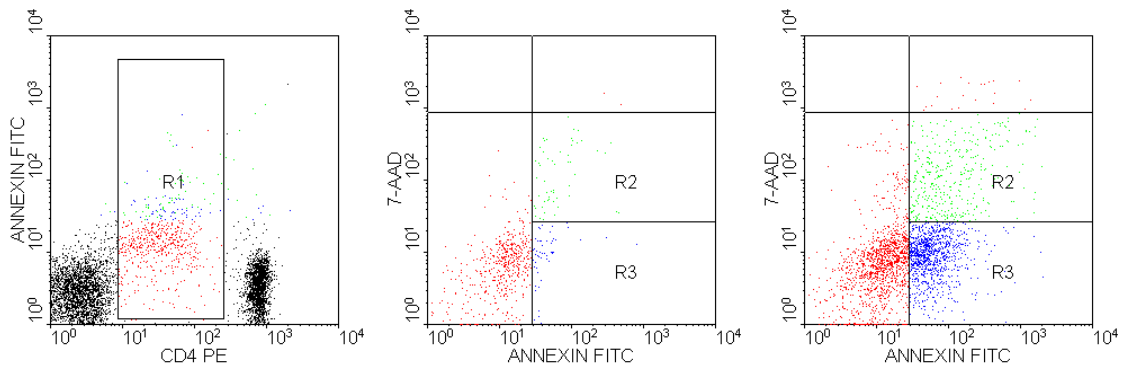


Abbildung 19: Darstellung der Anfärbung der Apoptose bei Monozyten (links Setzen der Region R1, in der Mitte die Negativkontrolle und rechts ein HIV-positiver Patient)

Durch multiparametrisches Gating mittels der Software Attractors 3.0™ wurden bei den niedrig CD8-exprimierenden Zellen (NK-Zellen) die Apoptoseraten und der Anteil der abgestorbenen Zellen berechnet.

Der Schwellenwert zur Aufnahme der Daten wurde auf das Vorwärtsstreulicht gesetzt, als Negativkontrolle wurde das Blut des täglichen Kontrollpatienten verwandt, die Quadranten und Regionen wurden anhand der Kontrollprobe gesetzt.

In die Datenbank übernommen wurden die prozentualen Anteile an früh- und spätapoptotischen Zellen, die gesamte Apoptoserate (als Summe aus R2 und R3) sowie der Anteil der toten Zellen an der Zahl der T-Helferzellen (CD4+), zytotoxischen T-Zellen (CD8+), Monozyten und NK-Zellen. Dies erfolgte jeweils getrennt für Proben, die mit oder ohne ATG inkubiert waren.



## 2.11 Statistische Auswertung

Die Auswertung und grafische Darstellung erfolgte unter Microsoft® Excel 2000 (Microsoft Corp., Seattle, Washington, USA) mit WinSTAT® für Microsoft® Excel (R. Fitch Software, Staufien) und STATISTICA Version 5.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

In der deskriptiven Statistik wurden Mittelwert, Median, Spannweite, 25 % und 75 %-Perzentile, sowie die Standardabweichung berechnet.

Die optische Darstellung wurde mit Box-Whisker-Plots durchgeführt, die den Median (kleines rotes Kästchen), die 25 % und 75 %-Perzentilen (als Unter- und Oberrand des grünen Kastens), die 5 % und 95 %-Perzentilen (als schwarze Querstriche) sowie die Spannweite der Messwerte (als Punkte für Minimal- und Maximalwert) enthalten. WinSTAT® bestimmt aus mathematischen Gründen bei einer Fallzahl von  $n < 20$  die 5 % und 95 %-Perzentilen nicht, sondern stellt nur die anderen Lageparameter dar. In Streudiagrammen sind Messwerte von Patienten grundsätzlich als rote Kästchen, die von gesunden Kontrollen als grüne Kreise eingezeichnet.

Die vorliegenden Daten sind nicht normalverteilt, daher wurde als nicht-parametrischer Test für unabhängige Stichproben nicht normalverteilter Daten der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney benutzt. Für verbundene Stichproben wurde das nicht-parametrische Pendant, der Wilcoxon-Test verwandt. Auf die Anführung der jeweiligen Teststatistik wurde verzichtet, stattdessen der zugehörige p-Wert angegeben, der einen leichteren Vergleich mit dem Signifikanzniveau ( $\alpha = 5\%$  oder  $\alpha = 1\%$ ) ermöglicht.

Zur Ermittlung der Korrelation und damit des Zusammenhanges zweier Merkmale wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ermittelt. Dieser Korrelationskoeffizient kann Werte von -1 bis 1 annehmen. Für die Testung auf Signifikanz wurde ebenfalls der p-Wert bestimmt.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Basiswerte der Patienten

Die unten stehende Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der hämatologischen Basiswerte sowie die Zusammensetzung der in der Untersuchung verwandten Stichprobe. Es sind Kontrollen und HIV-positive Patienten dargestellt, diese weiter unterteilt nach den zur Stadieneinteilung der HIV-Infektion von der CDC vorgeschlagenen Kategorien. Da die hämatologischen Parameter aus mit Heparin antikoaguliertem Blut ermittelt wurden, wurde die Thrombozytenzahl aufgrund der Heparin-induzierten Thrombozytenaggregation nicht bestimmt.

Tabelle 4: Basiswerte (Fallzahl, Geschlecht, Alter, Blutbild ohne Thrombozytenzahl und Differentialblutbild) der gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung)

	gesunde Kontrollen	HIV-positive Patienten, gesamt	HIV-positive Patienten, CDC-Kat. 1	HIV-positive Patienten, CDC-Kat. 2	HIV-positive Patienten, CDC-Kat. 3
<b>Fälle</b>	n = 11	n = 49	n = 14	n = 24	n = 11
<b>Geschlecht</b>	weiblich = 7 männlich = 4	weiblich = 8 männlich = 41	weiblich = 2 männlich = 12	weiblich = 4 männlich = 20	weiblich = 2 männlich = 9
<b>Alter (Jahre)</b>	25,7 $\pm$ 5,9	40,1 $\pm$ 9,5	36,5 $\pm$ 5,7	39,8 $\pm$ 9,2	45,6 $\pm$ 12,2
<b>Leukozyten / <math>\mu</math>l</b>	7377,3 $\pm$ 1852,2	5325,5 $\pm$ 1495,2	6181,4 $\pm$ 1616,8	5058,8 $\pm$ 1267,9	4818,2 $\pm$ 1468,7
<b>Erythrozyten / <math>\mu</math>l</b>	4,8 $\pm$ 0,5 (* 10 <sup>6</sup> )	4,2 $\pm$ 0,9 (* 10 <sup>6</sup> )	4,5 $\pm$ 0,8 (* 10 <sup>6</sup> )	4,1 $\pm$ 0,9 (* 10 <sup>6</sup> )	3,8 $\pm$ 0,9 (* 10 <sup>6</sup> )
<b>Hb (g / dl)</b>	14,1 $\pm$ 1,2	14,4 $\pm$ 1,7	14,9 $\pm$ 1,5	14,4 $\pm$ 1,4	13,6 $\pm$ 2,4
<b>% Lymphozyten</b>	34,2 $\pm$ 8,6	37,5 $\pm$ 9,6	40,8 $\pm$ 6,1	36,9 $\pm$ 10,0	34,5 $\pm$ 11,7
<b>% Monozyten</b>	7,4 $\pm$ 2,1	5,5 $\pm$ 1,8	5,8 $\pm$ 2,0	5,2 $\pm$ 1,5	5,8 $\pm$ 2,2
<b>% neutrophile Granulozyten</b>	55,7 $\pm$ 10,6	55,0 $\pm$ 16,6	48,7 $\pm$ 8,5	57,9 $\pm$ 21,0	56,6 $\pm$ 12,1
<b>% eosinophile Granulozyten</b>	1,9 $\pm$ 0,8	3,2 $\pm$ 2,9	3,7 $\pm$ 4,4	3,3 $\pm$ 2,2	2,3 $\pm$ 1,2
<b>% basophile Granulozyten</b>	0,7 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,5

## 3.2 Verlaufsparmeter der HIV-Infektion

### 3.2.1 Verlust von T-Helferzellen

Vergleicht man die Zahl der CD4+ Zellen bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten, so fällt ein signifikanter Abfall der Helferzellzahl bei HIV-Infizierten auf.

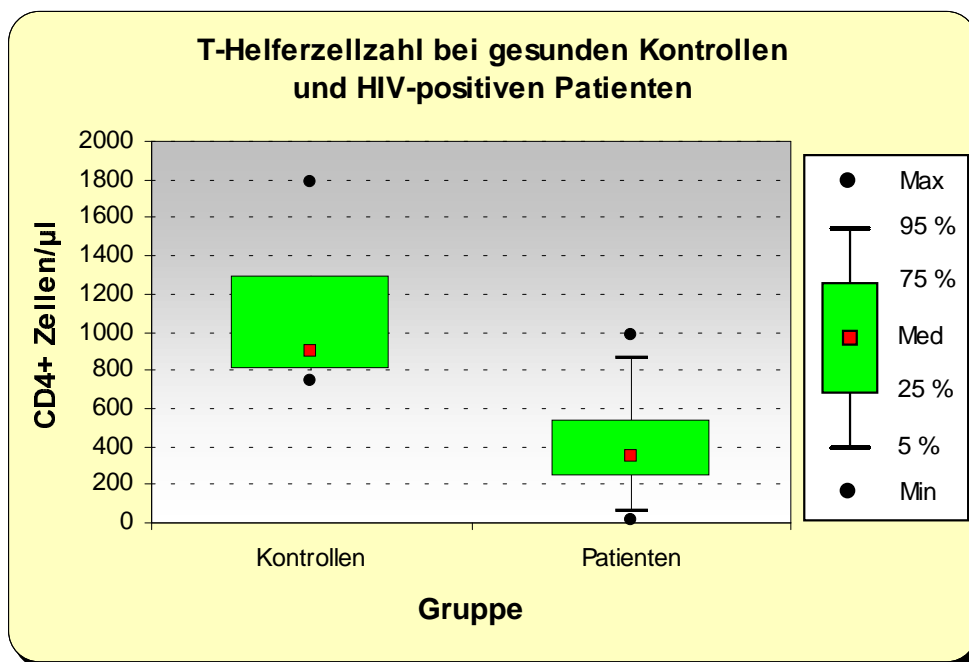


Abbildung 20: T-Helferzellzahl bei Kontrollen (n = 11) und Patienten (n = 49),  
p < 0,01 (U-Test)

Tabelle 5: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Zahl der CD4+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen	897,00	805,00	1294,00
Patienten	348,00	234,50	543,50

### 3.2.2 Autoantikörperbeladung der T-Helferzellen

Die gemessene Beladung der T-Zellen mit Autoantikörpern zeigt eine signifikant höhere Beladung der CD4+ Zellen bei HIV-Infizierten. Als Maß für die Autoantikörperbeladung wurde hier - entgegen der bei anderen Autoren häufig verwandten Praxis der Angabe eines Prozentwertes - die mittlere Fluoreszenzintensität der Färbung angegeben, um die Probleme einer Cut-Off-Linie zu eliminieren und um die unterschiedlich starke Beladung bei positiven Patienten differenzieren zu können (siehe 2.7). Die Mittelwerte der IgG-Beladung der CD4+ Zellen sind logarithmisch auf der Achse aufgetragen.

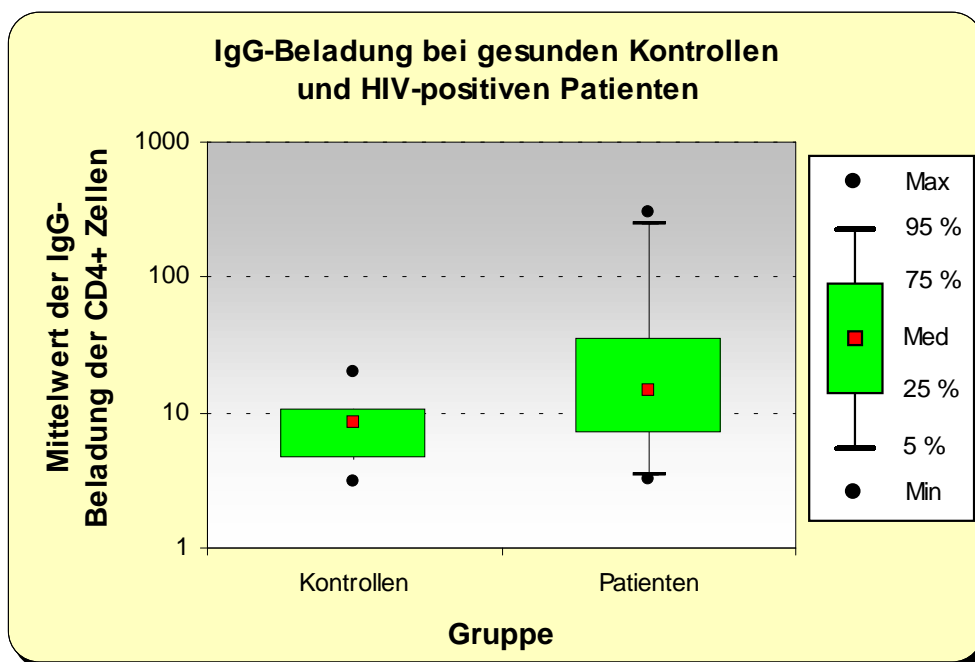


Abbildung 21: IgG-Beladung bei Kontrollen (n = 11) und Patienten (n = 49),  
p < 0,05 (U-Test)

Tabelle 6: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile des Mittelwertes der IgG-Beladung der CD4+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen	8,33	4,53	10,80
Patienten	14,78	7,01	35,21

### 3.2.3 Verhältnis zwischen Helferzellzahl und Autoantikörperbeladung

Das folgende Streudiagramm zeigt den Vergleich von T-Helferzellzahl und Autoantikörperbeladung bei Helferzellen. Die Messwerte der Autoantikörperbeladung sind wie unter 3.2.2 logarithmisch aufgetragen. Die Abbildung 22 suggeriert - durch die Darstellung der Werte von HIV-positiven Patienten und der gesunden Kontrollen - eine schwache, negative Korrelation zwischen Mittelwert der IgG-Beladung und Zahl der Helferzellen im Blut. Betrachtet man jedoch die Messwerte der HIV-positiven Patienten isoliert, ergibt sich keine Korrelation. Der Schluss auf einen Zusammenhang von Autoantikörperbeladung und Abfall der CD4+ Zellen im Verlauf der HIV-Infektion wird daher durch die vorliegenden Daten nicht unterstützt.

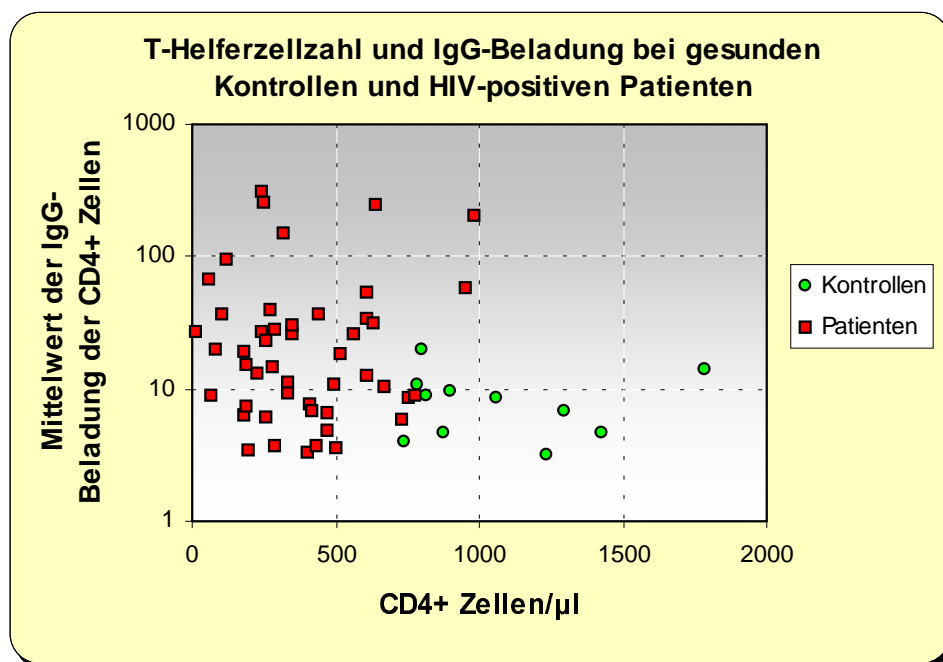


Abbildung 22: Verhältnis zwischen Zellzahl und Mittelwert der IgG-Beladung bei T-Helferzellen, Kontrollen (n = 11) und Patienten (n = 49), keine signifikante Korrelation bei HIV-positiven Patienten (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

### 3.2.4 Zusammenhang zwischen T-Helferzellzahl und Viruslast

Die graphische Darstellung des Verhältnisses von Helferzellzahl und Viruslast (logarithmisch aufgetragen) ergibt keine signifikante Korrelation. Die Werte der gesunden Kontrollen sind hier analog zur Abbildung 22 auf Seite 45 mit aufgeführt und liegen sämtlich unter der Nachweisgrenze der Methode (bDNA).

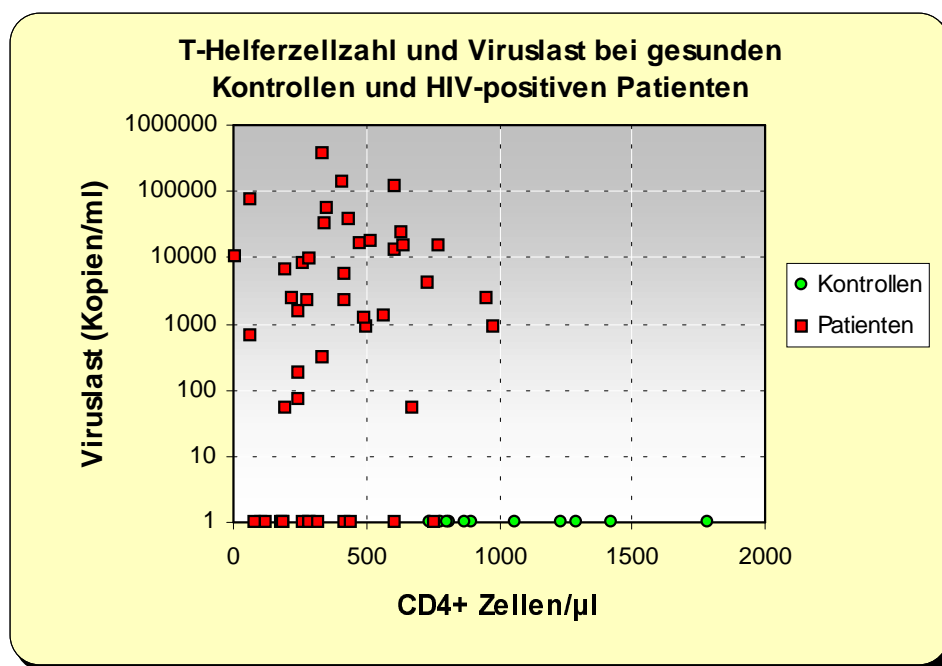


Abbildung 23: Verhältnis zwischen Zellzahl bei T-Helferzellen und Viruslast, Kontrollen (n = 11) und Patienten (n = 49), keine signifikante Korrelation bei HIV-positiven Patienten (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

### 3.3 Phagozytose von Lymphozyten durch autologe Makrophagen

#### 3.3.1 Messung der Phagozytose von T-Zellen im Durchflusszytometer

##### 3.3.1.1 Phagozytose von CD4+ Zellen bei gesunden Kontrollen

Der Effekt des Anti-Thymozyten-Globulins auf gesunde Kontrollpatienten wird in den folgenden Grafiken deutlich. Die Phagozytoserate ist bei Kontrollen, die mit ATG inkubiert wurden, signifikant höher als bei Inkubation ohne ATG (Abbildung 24). Die Abbildung 25 (Seite 48) zeigt die signifikante Korrelation der Inkubation mit und ohne ATG bei Kontrollen. Das Modell der Opsonierung der T-Lymphozyten mit ATG eignet sich somit als Positivkontrolle für die Untersuchung der Phagozytose in vitro.

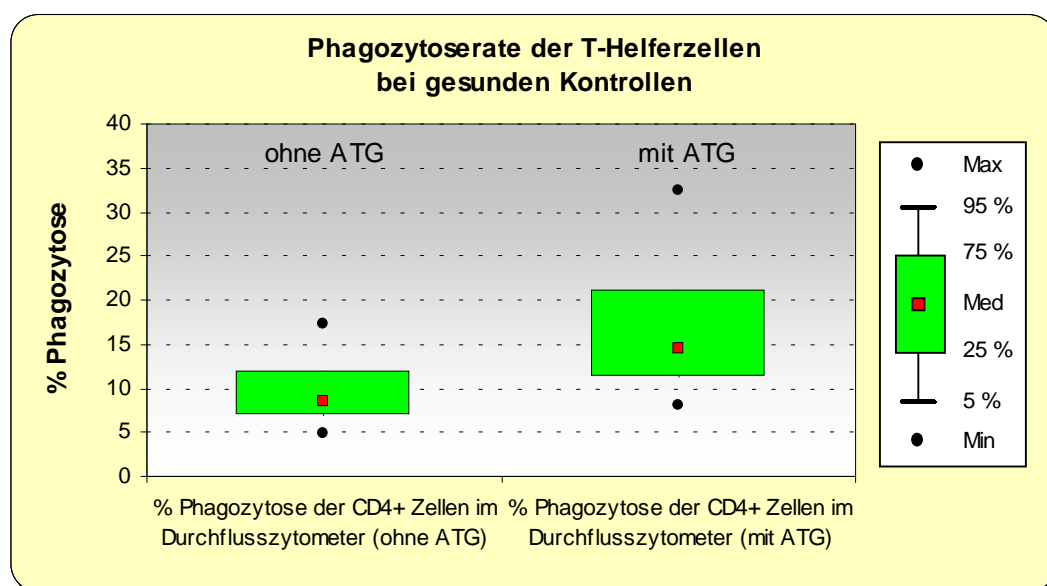


Abbildung 24: Phagozytoserate von CD4+ Zellen bei Inkubation ohne und mit ATG - gesunde Kontrollen (n = 11),  $p < 0,01$  (Wilcoxon-Test)

Tabelle 7: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Phagozytoserate der CD4+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen (ohne ATG)	8,59	6,93	12,00
Kontrollen (mit ATG)	14,54	11,19	21,06

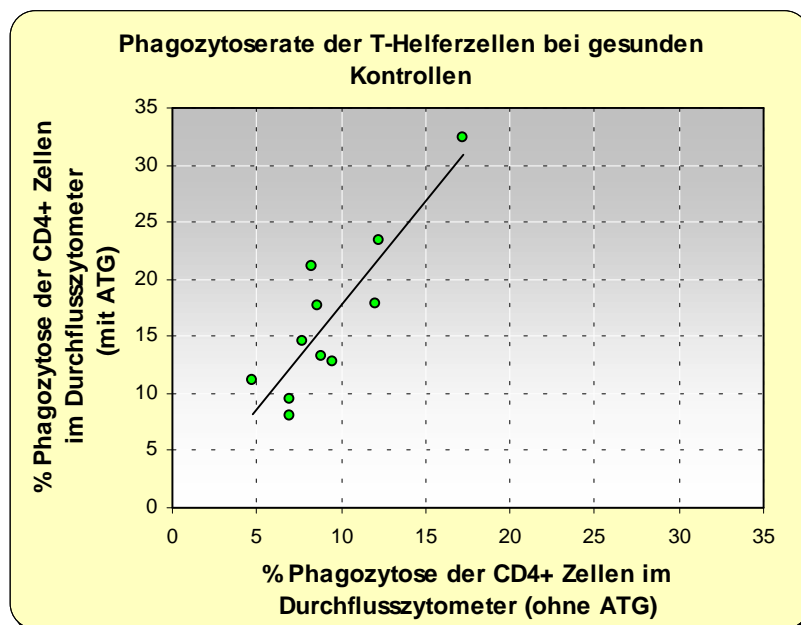


Abbildung 25: Verhältnis zwischen Phagozytose rate der CD4+ Zellen bei Inkubation mit und ohne ATG - gesunde Kontrollen (n = 11),  $r = 0,77$  mit  $p < 0,01$  (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

### 3.3.1.2 Phagozytose von CD4+ Zellen bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten

Der Vergleich der im Durchflusszytometer gemessenen Rate von CD4+ Zellen, die von einem autologen Makrophagen eliminiert wurden, weist eine signifikant höhere Phagozytoseaktivität bei HIV-Positiven im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nach (keine Zugabe von ATG).

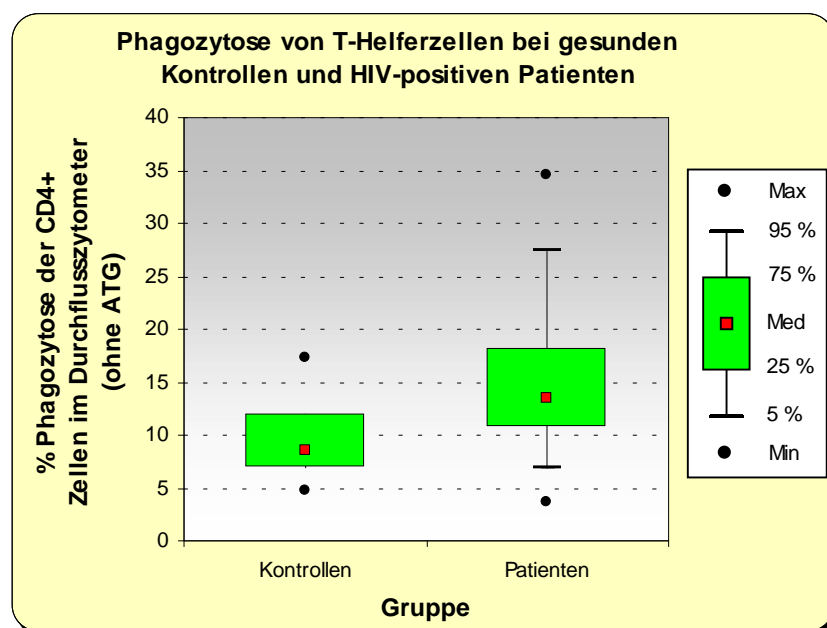


Abbildung 26: Verhältnis zwischen Phagozytose rate der CD4+ Zellen bei Kontrollen (n = 11) und Patienten (n = 49) ohne Zusatz von ATG,  $p < 0,01$  (U-Test)



Tabelle 8: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Phagozytoserate der CD4+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen	8,59	6,93	12,00
Patienten	13,47	10,66	18,22

Der analoge Vergleich für CD8+ T-Zellen zeigt einen deutlicheren, signifikanten Unterschied wie bei CD4+ Zellen, jedoch liegt die durchschnittliche Phagozytoserate nur etwa bei der Hälfte.

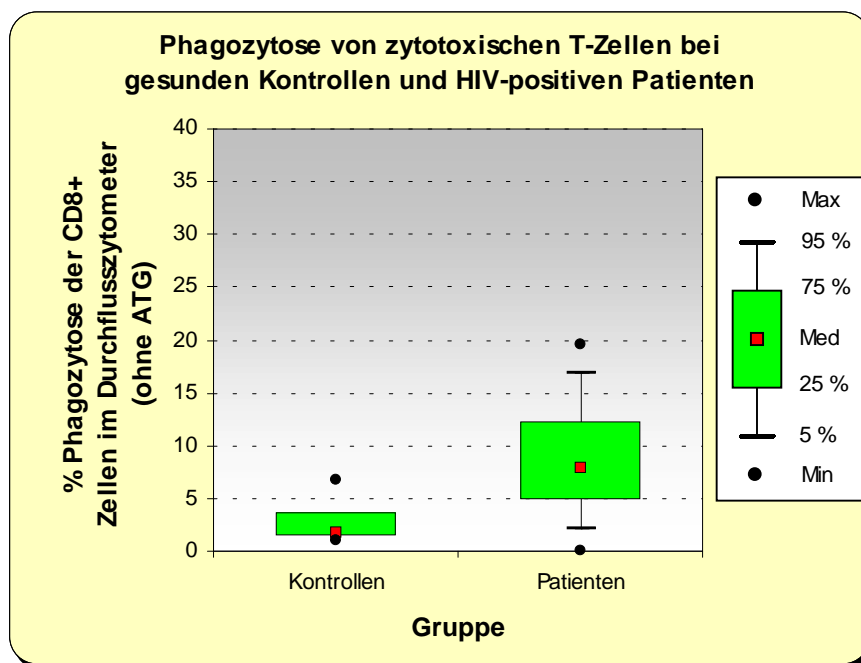


Abbildung 27: Verhältnis zwischen Phagozytoserate der CD8+ Zellen bei Kontrollen (n = 11) und Patienten (n = 49) ohne Zusatz von ATG,  $p < 0,01$  (U-Test)

Tabelle 9: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Phagozytoserate der CD8+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen	1,77	1,27	3,70
Patienten	7,84	4,77	12,24

### 3.3.1.3 Verhältnis zwischen Phagozytose von CD4+ und CD8+ Zellen

Vergleicht man die Phagozytoserate von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen, so fällt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden T-Zell-Untergruppen bei HIV-positiven Patienten auf. Die CD8+ Zellen werden signifikant seltener phagozytiert. Die Phagozytoseraten der jeweiligen Populationen korrelieren jedoch gut miteinander, wie das Streudiagramm zeigt.

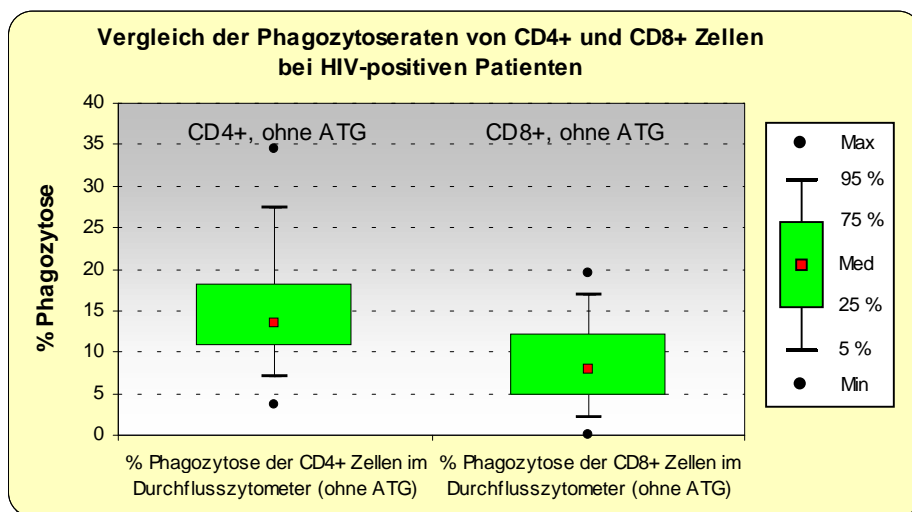


Abbildung 28: Verhältnis zwischen Phagozytoserate der CD4+ und CD8+ Zellen bei HIV-positiven Patienten (n = 49) ohne Zusatz von ATG,  $p < 0,01$  (Wilcoxon-Test)

Tabelle 10: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Phagozytoserate der CD4+ und CD8+ Zellen bei HIV+ Patienten (ohne ATG)

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
CD4+ Zellen	13,47	10,66	18,22
CD8+ Zellen	7,84	4,77	12,24

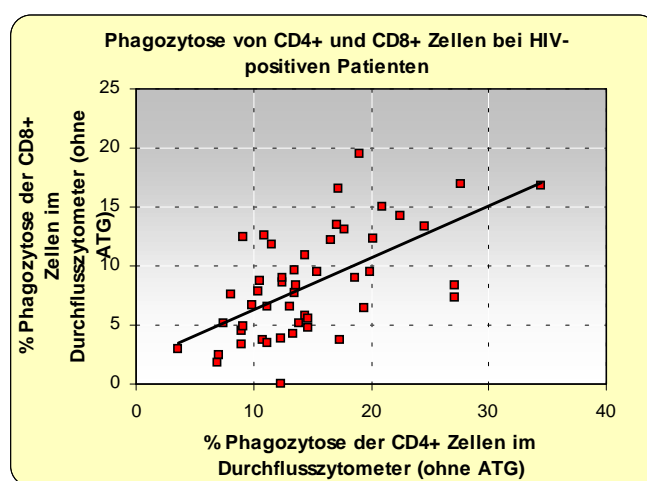


Abbildung 29: Verhältnis zwischen Phagozytoserate der CD4+ und CD8+ Zellen bei HIV-positiven Patienten (n = 49) ohne Zusatz von ATG,  $r = 0,61$  mit  $p < 0,01$  (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

### 3.3.1.4 Beziehungen zwischen Phagozytose von Lymphozyten und Viruslast

Es besteht eine sehr schwache negative Korrelation zwischen Viruslast und Phagozytose, sowohl von T-Helferzellen als auch von zytotoxischen T-Zellen. Die beiden folgenden Darstellungen enthalten die Messwerte von HIV-positiven Patienten mit messbarer Viruslast, die Achse der Viruslast ist logarithmisch aufgetragen. Die Regressionsgerade wurde aufgrund der logarithmischen Skalierung der Ordinate hier nicht eingezeichnet.

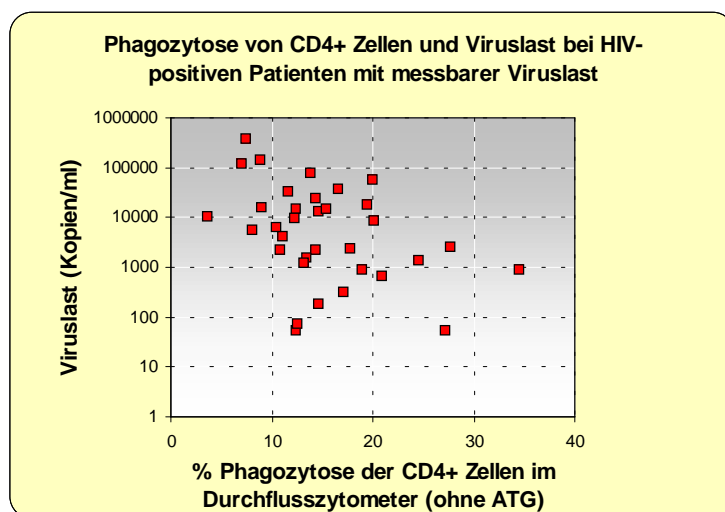


Abbildung 30: Verhältnis zwischen Phagozytoserate der CD4+ Zellen und Viruslast bei HIV-positiven Patienten (n = 34) mit messbarer Viruslast ohne Zusatz von ATG,  $r = -0,39$  mit  $p < 0,05$  (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

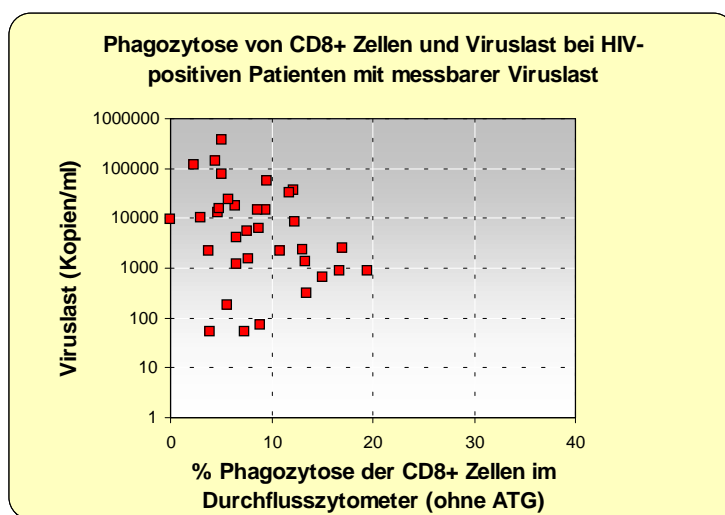


Abbildung 31: Verhältnis zwischen Phagozytoserate der CD8+ Zellen und Viruslast bei HIV-positiven Patienten (n = 34) mit messbarer Viruslast ohne Zusatz von ATG,  $r = -0,34$  mit  $p < 0,05$  (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

Für die Verhältnisse von Phagozytoserate zu IgG-Beladung oder Zahl der Helferzellen ergaben sich keine signifikanten Korrelationen.

Sowohl bei T-Helferzellen als auch bei zytotoxischen T-Zellen zeigt sich eine signifikant geringere Phagozytoserate bei virämischen Patienten (> 5000 Kopien/ml) im Kollektiv der HIV-Positiven mit messbarer Viruslast.

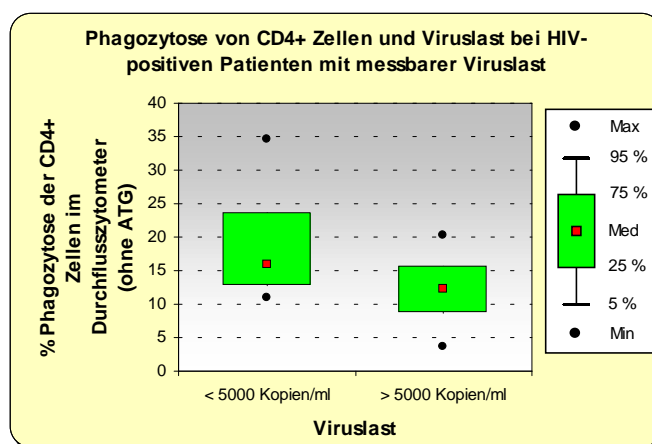


Abbildung 32: Phagozytoserate der CD4+ Zellen getrennt nach unterschiedlicher Viruslast bei HIV-positiven Patienten (n = 34) mit messbarer Viruslast ohne Zusatz von ATG,  $p < 0,05$  (U-Test)

Tabelle 11: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Phagozytoserate der CD4+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Viruslast < 5000 Kopien/ml	15,88	12,67	23,63
Viruslast > 5000 Kopien/ml	12,38	8,74	15,70

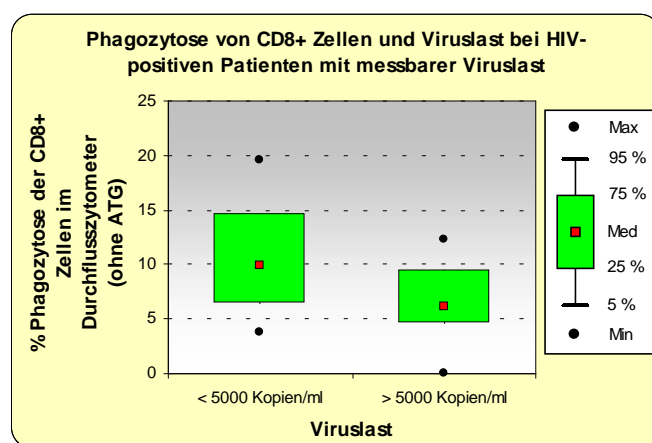


Abbildung 33: Phagozytoserate der CD8+ Zellen getrennt nach unterschiedlicher Viruslast bei HIV-positiven Patienten (n = 34) mit messbarer Viruslast ohne Zusatz von ATG,  $p < 0,05$  (U-Test)

Tabelle 12: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Phagozytoserate der CD8+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Viruslast < 5000 Kopien/ml	9,92	6,48	14,65
Viruslast > 5000 Kopien/ml	6,09	4,64	9,45

### 3.3.2 Validierung der Phagozytoserate im Mikroskop

#### 3.3.2.1 Phagozytose von Lymphozyten bei gesunden Kontrollen

Die in der mikroskopischen Auswertung der Phagozytose auf den Böden der Zellkulturplatten ermittelten Phagozytoseraten bei gesunden Kontrollen sind in der folgenden Abbildung 34 als Box-Whisker-Plot dargestellt. Obwohl grafisch ein Unterschied zu bestehen scheint, kann im Wilcoxon Test bei  $n = 11$  Kontrollen kein signifikanter Unterschied ermittelt werden ( $p = 0,05$ ). Im Streudiagramm zeigt sich ebenfalls keine Korrelation zwischen Kontrollen, die mit oder ohne ATG inkubiert wurden (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman). Die Darstellung erfolgt analog zu den unter 3.3.1.1 gezeigten Abbildungen der Messung der Phagozytoserate im Durchflusszytometer:

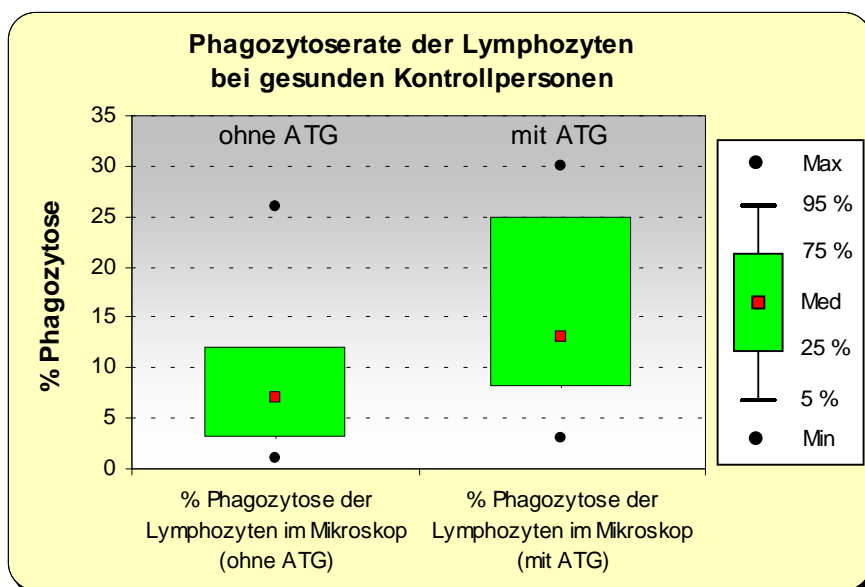


Abbildung 34: Phagozytoserate von Lymphozyten bei Inkubation ohne und mit ATG - gesunde Kontrollen ( $n = 11$ ), kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Test)

Tabelle 13: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Phagozytoserate der Lymphozyten

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen (ohne ATG)	7,00	3,00	12,00
Kontrollen (mit ATG)	13,00	8,00	25,00

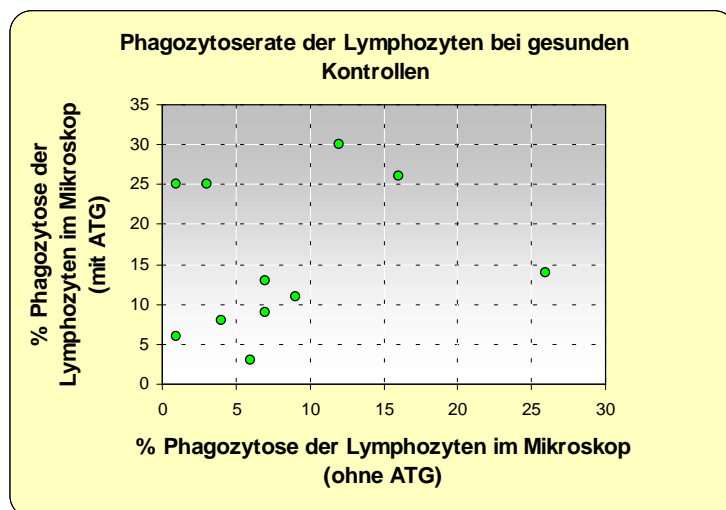


Abbildung 35: Verhältnis zwischen Phagozytoserate der Lymphozyten bei Inkubation mit und ohne ATG - gesunde Kontrollen (n = 11),  $r = 0,40$ , keine signifikante Korrelation (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

### 3.3.2.2 Phagozytose von Lymphozyten bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten

Vergleicht man die im Mikroskop ermittelten Phagozytoseraten von gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

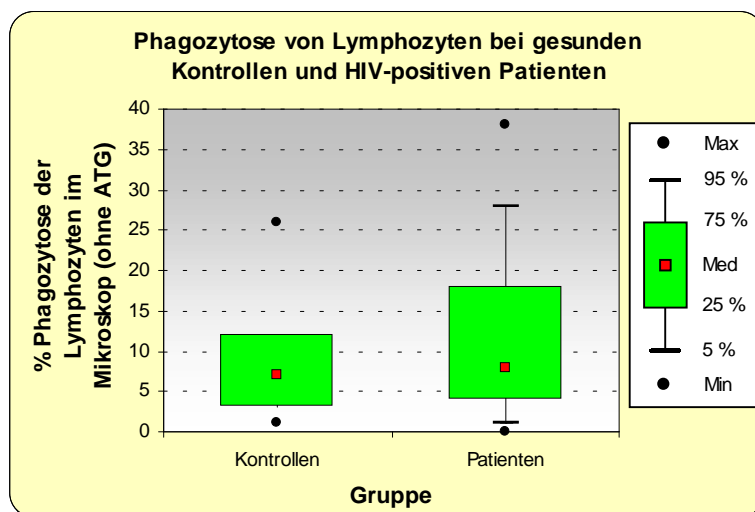


Abbildung 36: Verhältnis zwischen Phagozytoserate der Lymphozyten bei Kontrollen (n = 11) und Patienten (n = 49) ohne Zusatz von ATG, kein signifikanter Unterschied (U-Test)

Tabelle 14: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Phagozytoserate der Lymphozyten

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen	7,00	3,00	12,00
Patienten	8,00	4,00	18,00

### 3.3.3 Vergleich der im Durchflusszytometer und im Mikroskop gemessenen Phagozytoseraten

Im Folgenden sind die Phagozytoseraten der beiden Meßmethoden (Mikroskop und Durchflusszytometer) gegeneinander dargestellt. Die manuell im Mikroskop ausgezählte Phagozytoserate der Lymphozyten besitzt die größte Spannweite, die einzelnen Phagozytoseraten zeigen - testet man sie mittels Wilcoxon-Test gegeneinander - einen signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 16, Seite 56). Es kommen nur die Werte von HIV-positiven Patienten zur Darstellung.

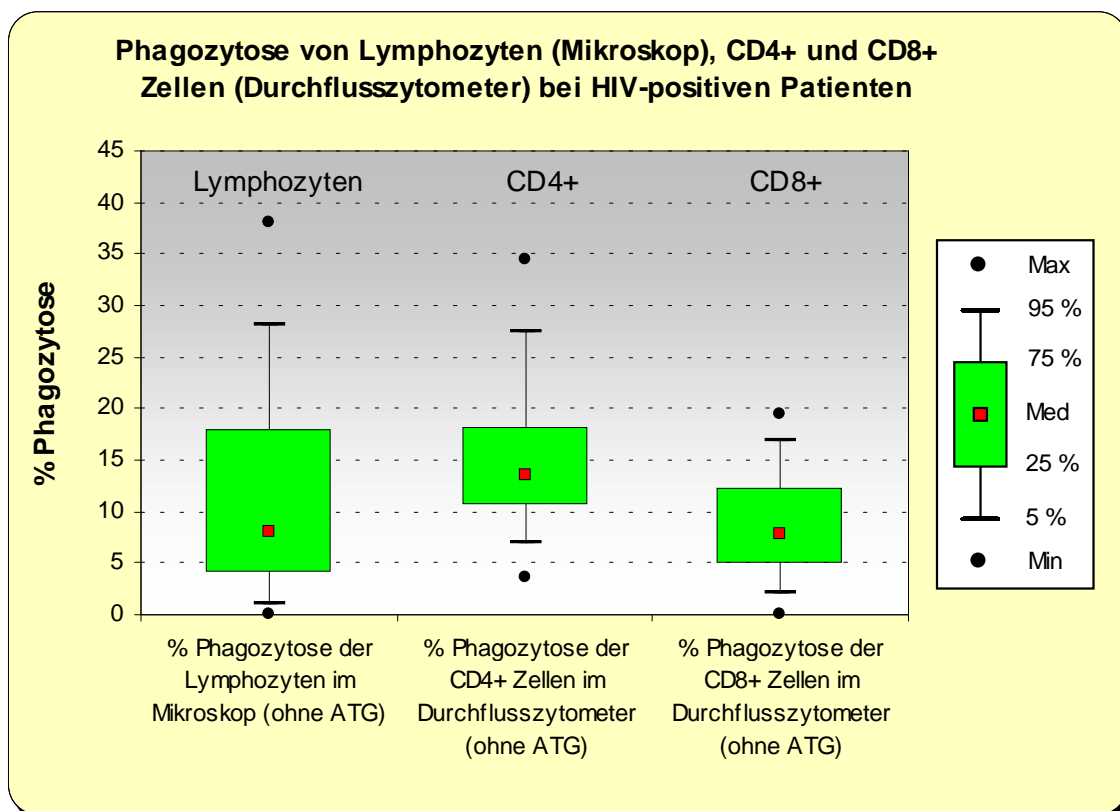


Abbildung 37: Phagozytoseraten von Lymphozyten (im Mikroskop gemessen) und Phagozytoseraten von CD4+ und CD8+ Zellen (im Durchflusszytometer gemessen) bei HIV-positiven Patienten ohne Zusatz von ATG (n = 49), Tests auf Signifikanz siehe folgende Tabelle 15

Tabelle 15: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Phagozytoserate der Lymphozyten, CD4+ und CD8+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
<b>Lymphozyten (Mikroskop)</b>	8,00	4,00	18,00
<b>CD4+ Zellen (Durchflusszytometer)</b>	13,47	10,66	18,22
<b>CD8+ Zellen (Durchflusszytometer)</b>	7,84	4,77	12,24

Tabelle 16: p-Werte des Wilcoxon-Tests der jeweiligen Gruppen (n = 49)

Gruppe	Lymphozyten (Mikroskop)	CD4+ Zellen (Durchflusszytometer)	CD8+ Zellen (Durchflusszytometer)
Lymphozyten (Mikroskop)		< 0,05	< 0,05
CD4+ Zellen (Durchflusszytometer)	< 0,05		< 0,01
CD8+ Zellen (Durchflusszytometer)	< 0,05	< 0,01	

Es besteht eine Korrelation zwischen der im Mikroskop und im Durchflusszytometer gemessenen Phagozytoserate, eine Vergleichbarkeit der Messungen ist damit prinzipiell gegeben. Diese Korrelation zwischen Phagozytoserate der Lymphozyten im Mikroskop und Phagozytoserate der CD4+ Zellen im Durchflusszytometer ist im Streudiagramm dargestellt (nur HIV-positive Patienten).

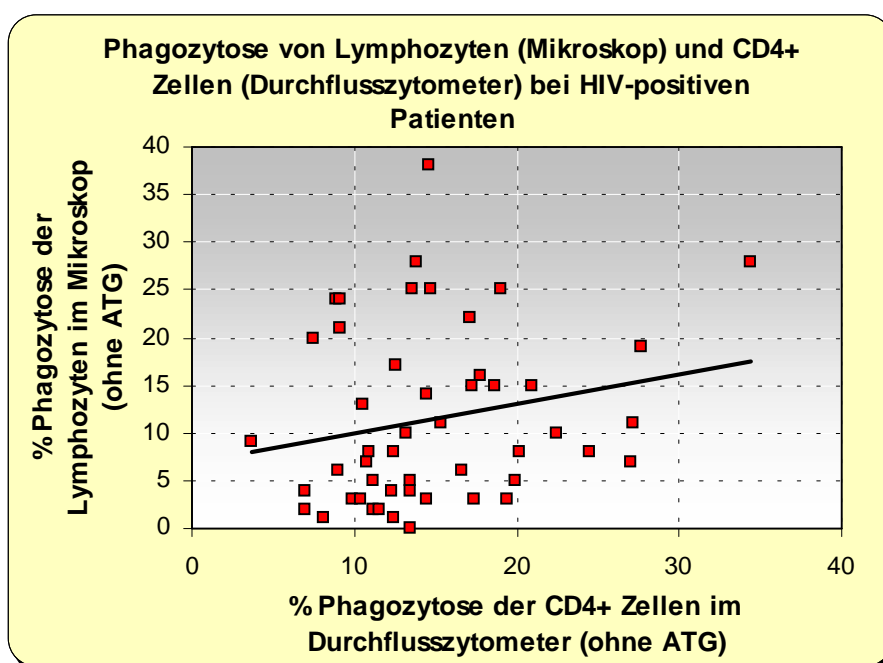


Abbildung 38: Verhältnis zwischen Phagozytoserate der Lymphozyten im Mikroskop und Phagozytoserate der CD4+ Zellen im Durchflusszytometer (Inkubation ohne ATG) - nur HIV+ Patienten,  $r = 0,27$ ,  $p < 0,05$  (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)



### 3.3.4 Ergebnisse zur Methodik des Phagozytoseassays

Während der Entwicklung des Phagozytoseassays zeigten sich folgende Möglichkeiten der Modifikation bzw. Fehlerquellen (auf die graphische Ergebnisdarstellung wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet):

- ATG reduziert die Expression von CD14 auf Monozyten/Makrophagen. Diese Tatsache muss beim Setzen der Gates Berücksichtigung finden.
- Bei der Gewinnung der Proben wurde auf Ammoniumheparinat-Monovetten der Firma Sarstedt zurückgegriffen, da sich kein Unterschied in den Ergebnissen zwischen Monovetten und mit Heparin benetzten Spritzen zeigte. Monovetten sind zudem einfacher und sicherer zu handhaben.
- Der Assay lässt sich bei Verzicht auf die manuelle Auszählung der Phagozytose auch direkt im Röhrchen für das Durchflusszytometer durchführen. Hierdurch entfällt die Verwendung von Zellkulturplatten. Die Ergebnisse sind dabei prinzipiell vergleichbar.
- Die Verwendung von Pyrogenen als Monozytenstimulans (z. B. bakterielle Lipopolysaccharide) steigert die Phagozytoserate nicht über das bei Inkubation mit ATG erreichte Niveau hinaus.
- Im Experiment erwiesen sich acht Stunden als optimale Inkubationsdauer. Obwohl nur schwer praktikabel, weil kaum in einen Arbeitstag zu integrieren, zeigte sich hier der beste Kompromiss zwischen Phagozytose und dem Absterben der Zellen im Inkubator.
- Die Beschichtung der Böden der Zellkulturplatten mit Kollagen bietet keinen Vorteil für die Adhärenz der Makrophagen und dient nicht als zusätzlicher Induktor der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.
- Die Untersuchung von M. C. Müller (80) zeigte einen unspezifischen Anstieg der Phagozytose durch Verwendung von mechanischen Mischern („Vortex-Mischer“). Auf die Verwendung von solchen Hilfsmitteln wurde daher bis nach der Inkubation verzichtet, die Proben stattdessen nur sanft per Hand geschwenkt.

### 3.4 Apoptose von Leukozyten

Die Messung der Apoptose erfolgte simultan mit der der Phagozytose bei Zellen aus derselben Ausbuchtung der Zellkulturplatte. Aufgrund eines nicht zeitgerecht behebbaren technischen Defektes konnten nur 20 der insgesamt 49 untersuchten Proben ausgewertet werden.

#### 3.4.1 Apoptose von T-Zellen bei gesunden Kontrollen

Der Vergleich der Apoptoseraten der T-Helferzellen bei Inkubation mit und ohne ATG weist keinen - durch ATG induzierten - signifikanten Unterschied der Apoptoserate bei gesunden Kontrollpersonen nach. Von einer Induktion der Apoptose durch Opsonierung mit ATG kann daher nicht ausgegangen werden. Die Apoptoseraten weisen jedoch bei opsonierten Lymphozyten eine deutliche größere Spannweite auf. Allerdings besteht keine signifikante Korrelation der beiden Apoptoseraten (Abbildung 40, Seite 59). Die Fallzahl ist mit  $n = 8$  relativ klein.

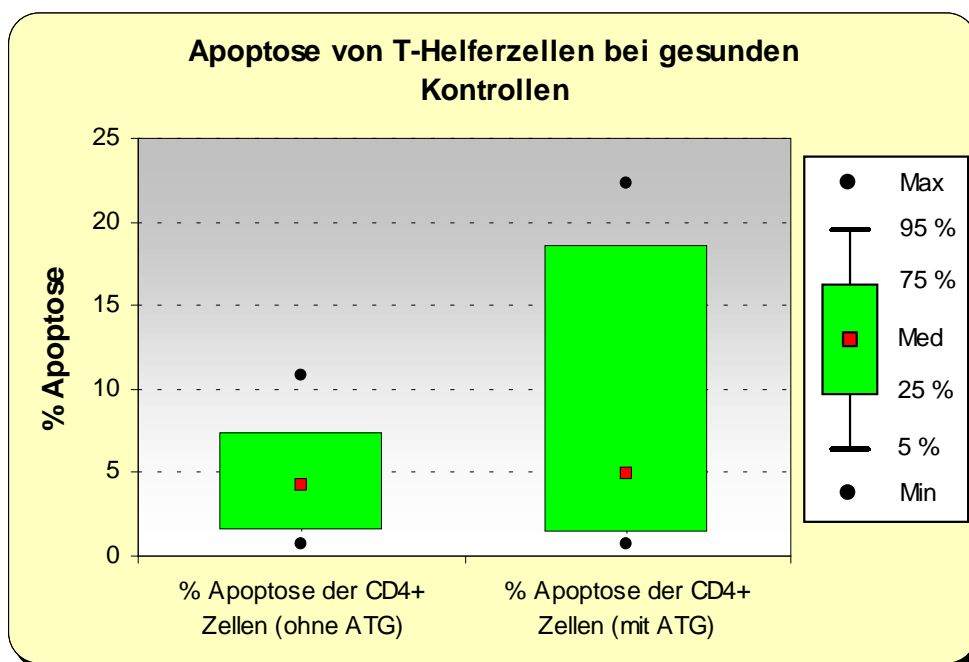


Abbildung 39: Apoptoserate von CD4+ Zellen bei Inkubation ohne und mit ATG - gesunde Kontrollen ( $n = 8$ ), kein signifikanter Unterschied (Wilcoxon-Test)

Tabelle 17: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Apoptoserate der CD4+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen (ohne ATG)	4,30	1,53	7,44
Kontrollen (mit ATG)	4,93	1,33	18,54

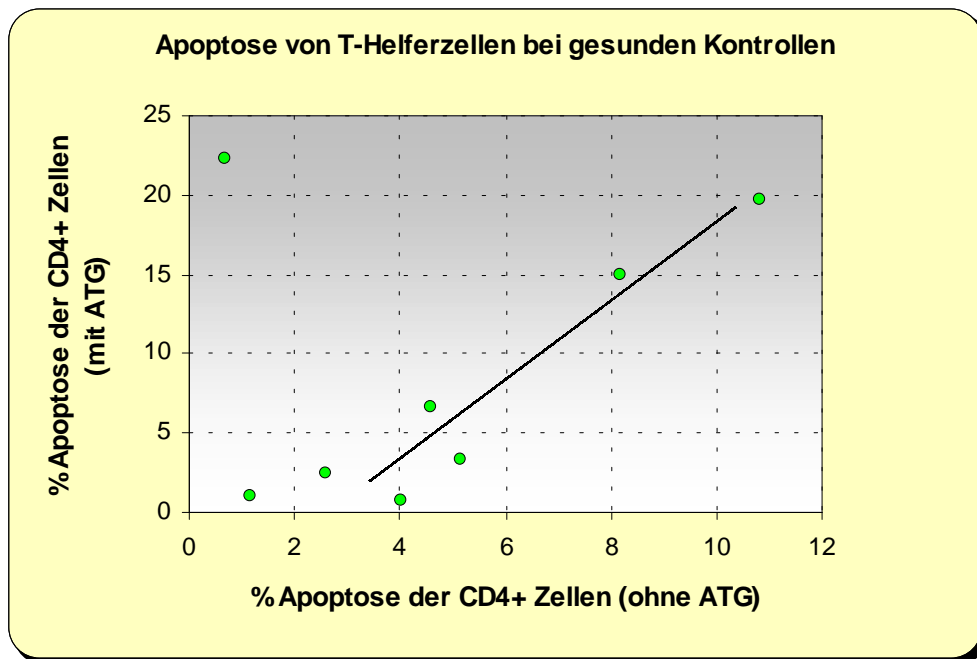


Abbildung 40: Verhältnis zwischen Apoptoserate der CD4+ Zellen bei Inkubation mit und ohne ATG - gesunde Kontrollen (n = 8),  $r = 0,24$ , keine signifikante Korrelation (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

Die in der Abbildung 40 eingezeichnete Korrelationsgerade stellt den Zusammenhang bei Elimination des Ausreißers dar.

Die Diagramme der Apoptose bei CD8-positiven Zellen zeigen einen analogen Zusammenhang und sind daher hier nicht dargestellt.

### 3.4.2 Apoptose von CD4+ Zellen bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten

Der Vergleich der Apoptoserate der CD4+ Zellen bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten (ohne ATG-Zusatz) weist eine signifikant höhere Apoptoserate bei HIV-Infizierten nach.

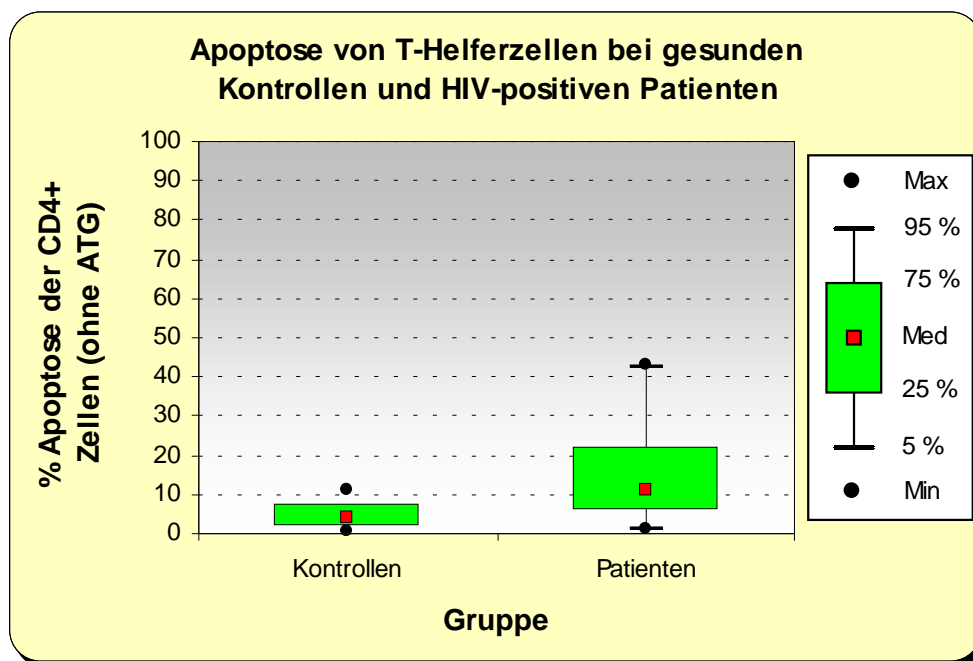


Abbildung 41: Verhältnis zwischen Apoptoserate der CD4+ Zellen bei Kontrollen (n = 8) und Patienten (n = 20) ohne Zusatz von ATG,  $p < 0,05$  (U-Test)

Tabelle 18: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Apoptoserate der CD4+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen	4,30	1,53	7,44
Patienten	11,08	5,56	22,10

### 3.4.3 Apoptose von CD8+ Zellen bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten

Vergleicht man die Apoptoserate der CD8+ Zellen bei Kontrollen und HIV-Infizierten (ohne ATG), so lässt sich kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate dieser Lymphozytensubpopulation zeigen.

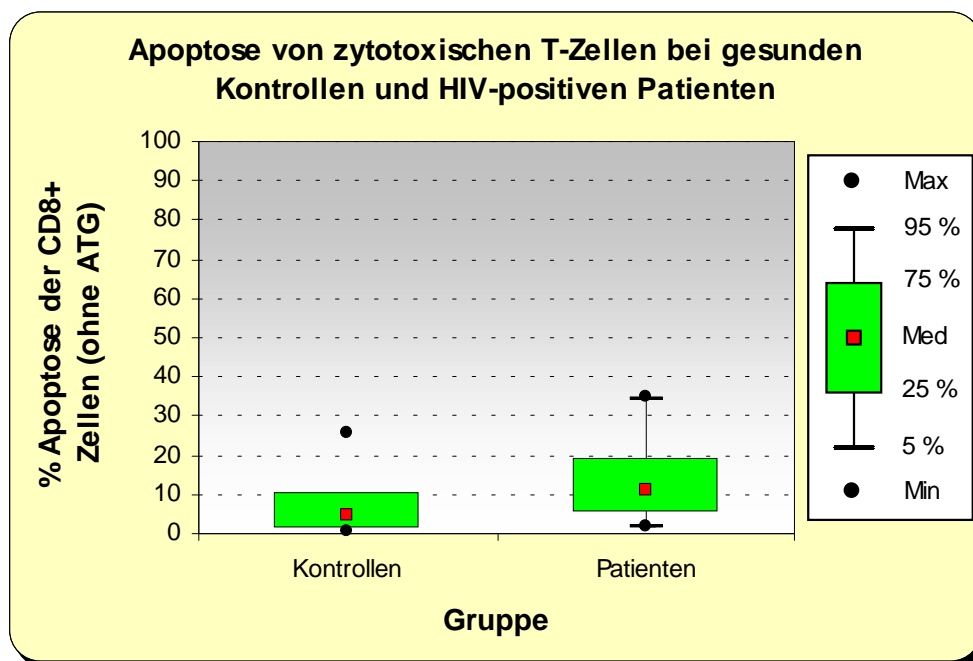


Abbildung 42: Verhältnis zwischen Apoptoserate der CD8+ Zellen bei Kontrollen (n = 8) und Patienten (n = 20) ohne Zusatz von ATG, kein signifikanter Unterschied (U-Test)

Tabelle 19: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Apoptoserate der CD8+ Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen	4,82	1,04	10,26
Patienten	10,77	5,23	18,99

### 3.4.4 Apoptose von Monozyten bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten

Einen hoch signifikanten Unterschied illustriert der folgende Box-Whisker-Plot. Die Monozyten der HIV-positiven Patienten unterliegen einer signifikant höheren Apoptose als die der Kontrollpersonen. Die Spannweite der Apoptoserate ist bei HIV-Positiven ebenfalls deutlich höher.

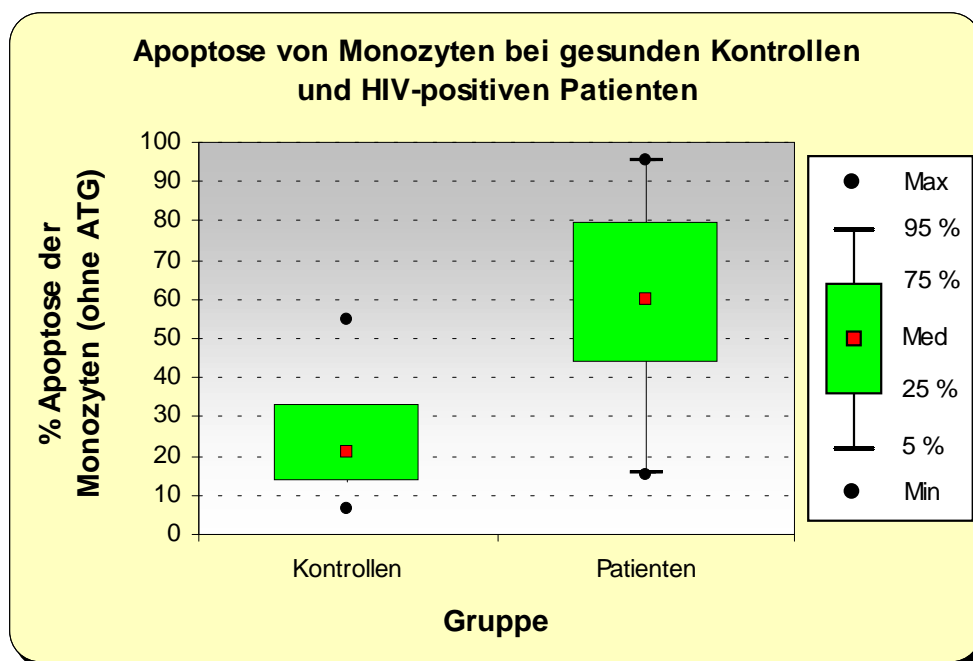


Abbildung 43: Verhältnis zwischen Apoptoserate der Monozyten bei Kontrollen (n = 8) und Patienten (n = 20) ohne Zusatz von ATG,  $p < 0,01$  (U-Test)

Tabelle 20: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Apoptoserate der Monozyten

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen	20,82	13,18	33,35
Patienten	60,09	43,35	79,40

### 3.4.5 Apoptose von NK-Zellen bei gesunden Kontrollen und HIV-positiven Patienten

Die NK-Zellen der HIV-Infizierten gehen nicht signifikant häufiger in Apoptose über als die der gesunden Kontrollen. Die größere Spannweite in der Apoptoserate der HIV-positiven Patienten zeigt sich aber auch hier (siehe Abbildung 43).

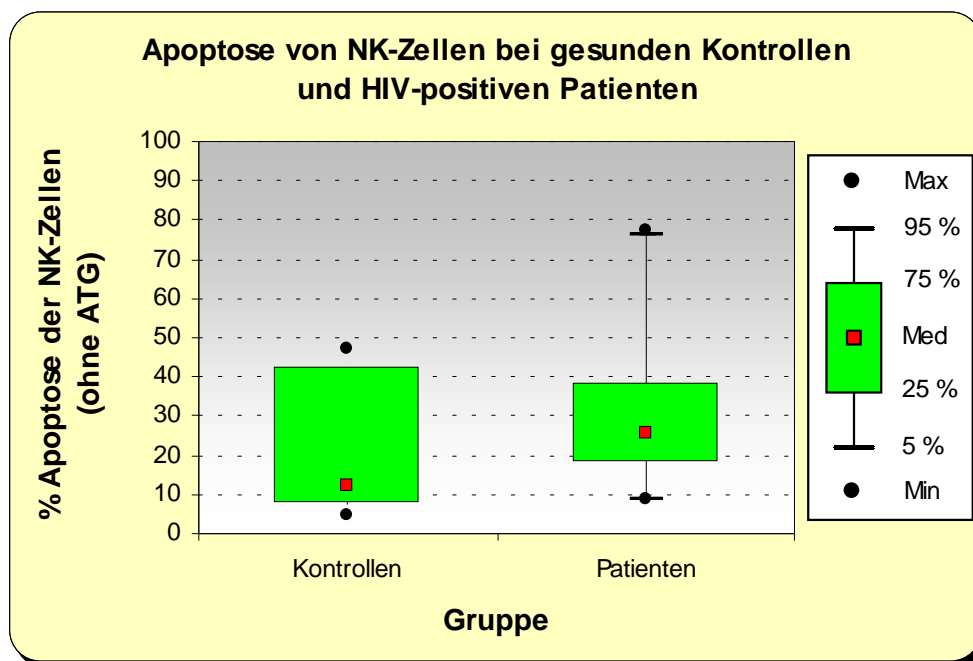


Abbildung 44: Verhältnis zwischen Apoptoserate der NK-Zellen bei Kontrollen (n = 8) und Patienten (n = 20) ohne Zusatz von ATG, kein signifikanter Unterschied (U-Test)

Tabelle 21: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Apoptoserate der NK-Zellen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
Kontrollen	12,19	7,57	42,23
Patienten	25,61	17,83	38,30

### 3.4.6 Zusammenfassender Vergleich der Apoptoseraten von Lymphozyten und Makrophagen

Die Apoptoseraten der untersuchten Populationen bei HIV-positiven Patienten sind, vergleicht man sie mittels Wilcoxon-Test, mit einer Ausnahme signifikant verschieden. Die Ausnahme stellen die Apoptoseraten von CD4+ und CD8+ Zellen dar, die keinen mit den angewandten Verfahren nachweisbaren Unterschied zeigen. Die Monozyten der HIV-Infizierten weisen die größte Apoptoserate auf, gefolgt von den NK-Zellen.

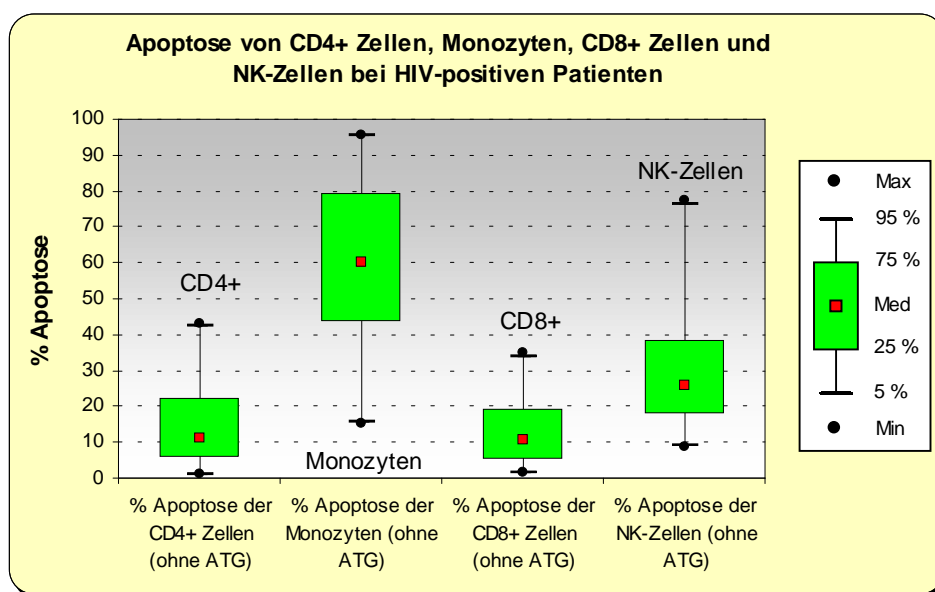


Abbildung 45: Vergleich der einzelnen Apoptoseraten von CD4+ Zellen, Monozyten, CD8+ Zellen und NK-Zellen HIV-positiver Patienten (n = 20) ohne Zusatz von ATG, Tests auf Signifikanz siehe folgende Tabelle 22

Tabelle 22: Median, 25 %- und 75 %-Perzentile der Apoptoserate der jeweiligen Gruppen

Gruppe	Median	25 %-Perzentile	75 %-Perzentile
CD4+ Zellen	11,08	5,56	22,10
Monozyten	60,09	43,35	79,40
CD8+ Zellen	10,77	5,23	18,99
NK-Zellen	25,61	17,83	38,30

Tabelle 23: p-Werte des Wilcoxon-Tests der jeweiligen Gruppen (n = 20)

Gruppe	CD4+ Zellen	Monozyten	CD8+ Zellen	NK-Zellen
CD4+ Zellen		< 0,01	≥ 0,05	< 0,01
Monozyten	< 0,01		< 0,01	< 0,01
CD8+ Zellen	≥ 0,05	< 0,01		< 0,01
NK-Zellen	< 0,01	< 0,01	< 0,01	

Für das Verhältnis der Apoptose von CD4+ bzw. CD8+ Zellen, Monozyten und NK-Zellen zu Verlaufsparemtern der HIV-Infektion wie CD4-Zellzahl, IgG-Beladung oder Viruslast ergaben sich keine signifikanten Korrelationen.



## 3.5 Verhältnis zwischen Apoptose und Phagozytose bei Lymphozyten

### 3.5.1 Verhältnis von Apoptose und Phagozytose bei CD4+ Zellen

Im Streudiagramm von Apoptose- und Phagozytoserate der T-Helferzellen bei HIV-positiven Patienten lässt sich keine signifikante Korrelation der beiden Parameter darstellen.

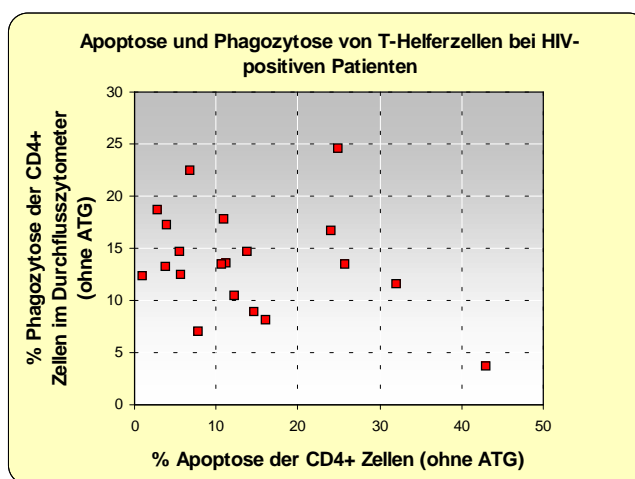


Abbildung 46: Verhältnis von Apoptoserate der CD4+ Zellen und Phagozytoserate der CD4+ Zellen (ohne ATG) - HIV-positive Patienten (n = 20),  $r = -0,26$ , keine signifikante Korrelation (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

### 3.5.2 Verhältnis von Apoptose und Phagozytose bei CD8+ Zellen

Die analoge Darstellung zu 3.5.1 bei zytotoxischen T-Zellen weist ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Phagozytose und Apoptose nach.

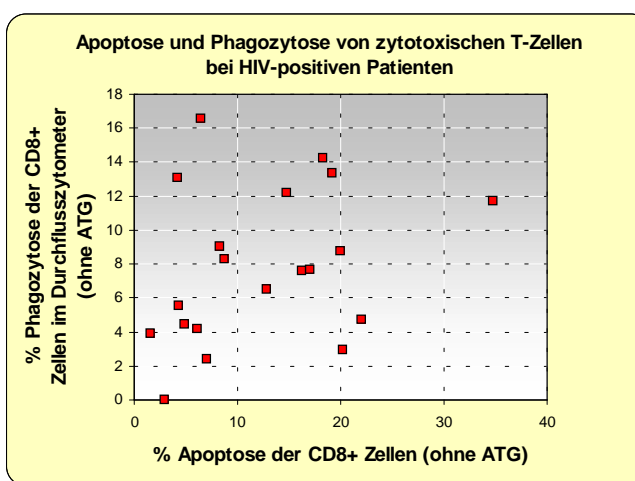


Abbildung 47: Verhältnis von Apoptoserate der CD8+ Zellen und Phagozytoserate der CD4+ Zellen (ohne ATG) - HIV-positive Patienten (n = 20),  $r = 0,30$ , keine signifikante Korrelation (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman)

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Verlaufsparemeter der HIV-Infektion

Der Abfall der T-Helferzellzahl im Blut der HIV-infizierten Patienten während des Verlaufes der Erkrankung und der resultierende Immundefekt waren schon früh nach Bekanntwerden der ersten klinischen Fälle ein akzeptierter Marker des Erkrankungsverlaufes (82). Noch bevor die Viruslast im Blut gemessen werden konnte, wurde neben der klinischen Untersuchung die Messung der Helferzellzahl als prognostischer Marker vorgeschlagen und 1993 auch von der CDC im kombinierten Klassifizierungssystem empfohlen (20). Als weiterer Verlaufsparemeter wird heute die Viruslast im Blut ebenfalls routinemäßig bestimmt. Diese Messung erfolgt auch mit prognostischer Zielsetzung, dient aber in Praxi eher der Erfolgskontrolle der antiretroviralen Therapie, zumal Meta-Analysen einen Vorteil der T-Helferzell-Messung für längerfristige prognostische Aussagen erkennen ließen (39, 92). C. Müller et al. aus der Bonner Arbeitsgruppe um R. Bauer wiesen 1994 das Vorkommen antilymphozytärer Antikörper bei der Mehrzahl der HIV-Patienten nach (79). Das Auftreten und die Menge dieser Antikörper korrelierte mit dem Abfall der Helferzellzahl im Blut. Aufgrund dieser Befunde und der Untersuchungen von Daniel et al. (101, 28, 30, 27) wurde die Autoantikörperbeladung in Form von IgG in der hier vorliegenden Untersuchung ebenfalls ermittelt. Durch Bestimmung dieser drei Parameter sollten die gemessenen Phagozytose- und Apoptoseraten mit dem Verlauf der HIV-Infektion in Bezug gesetzt werden.

Das untersuchte Kollektiv von  $n = 49$  Patienten teilte sich zu etwa der Hälfte in das CDC-Stadium 2 und zu je einem Viertel in die Stadien 1 und 3. Es bestand ein deutliches Überwiegen männlicher Probanden, Patienten im CDC-Stadium 3 waren im Mittel am ältesten (Tabelle 4, Seite 42). Die signifikant verminderte Helferzellzahl von im Mittel 897 Zellen (gesunde Kontrollen) auf 348 Zellen (HIV-positive Patienten) entsprach den Erwartungen (Abbildung 20, Seite 43) und steht in Einklang mit den oben erwähnten Untersuchungen. Auch die signifikant höhere IgG-Beladung der T-Helferzellen (Abbildung 21, Seite 44) ist gut mit den Ergebnissen von C. Müller et al. (79) und Daniel et al. (27) vereinbar. Ein direkter numerischer Vergleich der Raten ist jedoch nicht möglich, da in der vorliegenden Untersuchung erstmalig kein prozentualer Wert bestimmt, sondern die IgG-Beladung in Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Dies ermöglichte eine Darstellung und Analyse der Messwerte, die das Ermitteln eines Schwellenwertes entbehrlich macht. C. Müller et al. bewerteten Patienten, bei denen mehr als 10 % der CD4-positiven Zellen IgG-Beladung zeigen, als positiv, Daniel et al. legen den Schwellenwert auf 30 %. Im Institut für Klinische Chemie Mannheim hat sich bei der Befundung der IgG-Beladung in der Routinediagnostik eine visuelle Beurteilung mit Einteilung in negative, leichte, mittlere und hohe IgG-Beladung etabliert (Nebe, persönliche Mitteilung). Das - auch methodenabhängige - Setzen eines Schwellenwertes wurde durch die Anwendung der Fluoreszenzintensität als Wert für die Autoantikörperbeladung vermieden. Die Einstellung der Verstärkung des Zytometers, welche die Höhe der Fluoreszenzintensität beeinflusst, sollte genau an Eichpartikeln erfolgen. Die Obergrenze für die Kontrollpersonen liegt dann bei einer Fluoreszenzintensität von etwa 10 relativen Einheiten.

Die Untersuchungen von Daniel et al. zeigten ferner, dass Patienten, die eine IgG-Beladung aufwiesen, in der Regel auch mit gp120 und IgM beladene CD4<sup>+</sup> Zellen besaßen (27). Sie schlossen auf die Existenz von Immunkomplexen, bestehend aus IgG, IgM, gp120 und Komplementfaktoren, die einen Beitrag zur Pathogenese der Verminderung der Helferzellzahl darstellen könnten, da in ihrem Kollektiv eine hohe Antikörperbeladung mit abnehmender Helferzellzahl korrelierte (31).

In der hier vorliegenden Untersuchung zeigte sich zwar ebenfalls, dass eine hohe IgG-Beladung mit einer geringen T-Helferzellzahl einher geht, ein statistisch signifikanter Zusammenhang ließ sich jedoch nicht sichern (Abbildung 22, Seite 45). Eine ähnliche Problematik sahen C. Müller et al. (79): Sie zeigten eine signifikante negative Korrelation zwischen antilymphozytären Antikörpern und der T-Helferzellzahl bei Patienten mit mehr als 100 CD4<sup>+</sup> Zellen/ $\mu$ l ( $n = 54$ ). Für Patienten mit weniger als 100 CD4<sup>+</sup> Zellen/ $\mu$ l gelang ihnen kein signifikanter Nachweis einer Korrelation ( $n = 24$ ). Die große Variabilität der gemessenen Werte zeigt sich auch in Abbildung 22 (die Regressionsgerade wurde hier aus didaktischen Gründen nicht eingezeichnet), bei der Arbeit von C. Müller et al. wird dies an der Abweichung der Messwerte von der vorhandenen Regressionsgerade deutlich. Die Arbeitsgruppe um C. Müller schließt daher auf eine komplexe Ursache des Verlustes von T-Helferzellen.

In der Dissertation von M. C. Müller aus dem Institut für Klinische Chemie Mannheim (80), die zusätzlich noch die IgG-Beladung bei CD8<sup>+</sup> Zellen und die Komplementbeladung bei CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen zum Gegenstand hatte, stellten sich hoch signifikante Korrelationen zwischen IgG auf T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen, sowie zwischen dem Komplementfaktor C3c auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen heraus ( $n = 116$ ). M. C. Müller postulierte deshalb wie auch die anderen vorher genannten Autoren eine multifaktorielle Genese des Helferzellverlustes und lehnte eine allein gegen CD4<sup>+</sup> Zellen gerichtete Immunreaktion als einzigen Grund der CD4-Depletion ab.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen Viruslast und Zahl der Helferzellen bei HIV-positiven Patienten, so stützen die in dieser Dissertation gewonnenen Daten die schon häufig gezeigte höhere Viruslast und die geringere Zahl von Helferzellen in späten Stadien der Infektion (Abbildung 23, Seite 46). Eine signifikante Korrelation zwischen dem Abfall der Helferzellzahl und dem Ansteigen der Viruslast ergab sich nicht. Ho et al. (47) wiesen eine negative Korrelation zwischen Viruslast und Zahl der CD4<sup>+</sup> Zellen bei HIV-positiven Patienten ohne Therapie nach. Dies gelang ihnen bei asymptomatischen Virusträgern (CDC-Kategorie A) und Patienten mit AIDS (CDC-Kategorie C), nicht jedoch bei symptomatischen Patienten (CDC-Kategorie B). Katzenstein et al. (60) beschrieben 1996 ebenfalls eine negative Korrelation zwischen Viruslast und Helferzellzahl in einer Longitudinaluntersuchung bei Patienten nach der Serokonversion. Beide Untersuchungen ermittelten eine negative Korrelation bei Patienten, die noch nicht mit HAART therapiert wurden. Die Kinetik in der Restitution der CD4-Zellzahl und der rapide Abfall der Viruslast nach Einleitung der antiretroviralen Therapie (35) sind eine mögliche Störgrößen, die dazu führen können, dass der erwartete Zusammenhang zwischen Viruslast und Helferzellzahl in der vorliegenden Querschnittuntersuchung an Patienten unter Therapie nicht nachzuweisen ist.

Es soll hier betont werden, dass sich das untersuchte Kollektiv aus Patienten zusammensetzte, die mit hoch aktiver antiretroviraler Therapie (HAART) behandelt wurden, ein Gewinnen von Blutproben unbehandelter Infizierter ist durch die frühzeitige Einleitung der Therapie in der westlichen Welt kaum mehr möglich. Obwohl die Empfehlungen der Fachgesellschaften unterschiedlich sind, entscheiden sich die meisten klinisch tätigen Ärzte für die Einleitung antiretroviraler Therapie bei T-Helferzellzahlen zwischen 200 und 500 pro  $\mu$ l oder Auftreten von

Symptomen, ein Absetzen der Therapie resultiert zumeist in einem Ansteigen der Viruslast auf Werte vor Einleitung der Therapie (43). Daher wird von manchen Autoren von einem Startpunkt der Viruslast ausgegangen („viral load set-point“).

Ein Zusammenhang zwischen Viruslast und erhöhter IgG-Beladung ließ sich in den vorliegenden Daten nicht sichern, auch Daniel et al. fanden hierfür keinen Anhalt (27).

## 4.2 Phagozytose von Lymphozyten

Zielsetzung in der Entwicklung des Phagozytose-Testes war die objektive Messung der Phagozytose von Lymphozyten durch autologe Makrophagen im Durchflusszytometer. Die Arbeit von M. C. Müller (80) zeigte, dass es sich bei der Phagozytose von Lymphozyten durch Makrophagen um einen pathogenetischen Mechanismus handeln könnte, der zur Verminderung der CD4-Zellzahl bei HIV-Infizierten beiträgt. Ihm gelang erstmalig in einem aufwändigen Test auf Objektträgern der lichtmikroskopische Nachweis dieser Form der Phagozytose. Die hier vorliegende Untersuchung stellt nun eine Methode vor, mit der die Phagozytose erstmalig an großen Zellzahlen im Durchflusszytometer gemessen wurde. Durch die dafür nötige Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern konnten Lymphozytensubpopulationen getrennt untersucht werden.

Als Modell für die Beladung der Lymphozyten mit Antikörpern wurde die Inkubation mit Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) eingesetzt. Abbildung 24 (Seite 47) stellt bei gesunden Kontrollpersonen den Effekt der Zugabe von ATG auf die Phagozytose von T-Helferzellen dar. ATG steigert die Phagozytose signifikant von einer medianen basalen Rate um 8,5 % auf annähernd 15 %. Die Werte der Phagozytose mit und ohne ATG bei gesunden Kontrollen korrelieren im Streudiagramm (Abbildung 25, Seite 48) gut und signifikant miteinander. Für zytotoxische Zellen ergaben sich prinzipiell vergleichbare, signifikante Ergebnisse bei jedoch deutlich geringerer Phagozytoserate. Die Verwendung von ATG eignet sich somit als Positivkontrolle, die Opsonierung mit Antikörpern wie ATG stellt einen Phagozytosereiz für Makrophagen dar. Eine mögliche Ursache der höheren Phagozytoserate der CD4+ Zellen beim Gesunden kann im Verhältnis der Zahl der CD4+ zur Zahl der CD8+ Zellen liegen. Der Ansatz mit ATG wurde neben der gesunden Kontrollperson (Negativkontrolle) bei allen untersuchten Patienten als Positivkontrolle mitgeführt.

Bei HIV-positiven Patienten ergab sich eine signifikant erhöhte Phagozytoserate von CD4+ und von CD8+ Zellen gegenüber der Kontrollpopulation (ohne Stimulation mit ATG). Die Makrophagen der Infizierten phagozytierten zu ca. 13,5 % eigene CD4+ Lymphozyten (Abbildung 26, Seite 48) und zu knapp 8 % eigene zytotoxische T-Zellen (Abbildung 27, Seite 49). Die mediane Phagozytoserate der Kontrollen lag bei ca. 8,5 % (CD4+ Zellen) und 1,8 % (CD8+ Zellen). Die vorliegenden Zahlen sprechen für eine signifikant erhöhte Phagozytose der Lymphozyten bei HIV-Infizierten und stützen die Hypothese einer Beteiligung der Phagozytose am Verlust der T-Helferzellen. M. C. Müller (80) fand für Lymphozyten bei der Ermittlung der Phagozytoserate im Mikroskop eine basale Phagozytoserate der Kontrollen von ca. 30 %, die bei hochgradig IgG-beladenen Patienten auf etwa 60 % stieg. Die Verdoppelung der Phagozytoserate bei Infizierten zeigte sich auch bei ihm, allerdings auf deutlich höherem Niveau mit einer basalen Phagozytoserate von 30 %.

Stellt man die beiden untersuchten Lymphozytensubpopulationen der HIV-Infizierten gegenüber, so fällt ein signifikanter Unterschied in der Phagozytoserate von T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen auf (Abbildung 28, Seite 50). In der vorliegenden Untersuchung wurde damit erstmalig eine vermehrte Phagozytose der CD4+ Zellen gezeigt. M. C. Müller (80) konnte im lichtmikroskopischen Test die phagozytierten Lymphozyten nicht weiter differenzieren und ging von einer gleichmäßigen Phagozytose von CD4+ und CD8+ Zellen aus, da die beiden Subpopulationen in seiner Untersuchung annähernd gleich opsoniert waren. Daniel et al. zeigten jedoch, dass nur gegen CD4+ Zellen gerichtete Autoantikörper mit dem Abfall von CD4+ und CD8+ Zellen assoziiert waren, Antikörper gegen zytotoxische T-Zellen nicht (29). Der Schluss auf gleiche Phagozytoserate aufgrund ähnlicher Autoantikörperbeladung wird durch die vorliegenden Daten nicht gestützt. Daniel et al. vermuten eine gestörte regula-

torische Funktion als Faktor beim Abfall der CD8-Zellzahl. Die unterschiedlichen Phagozytoseraten der CD4+ und CD8+ Zellen sind mit den Ergebnissen von Daniel et al. gut vereinbar, zumal Autoantikörper gegen CD8+ Zellen auch bei gesunden Personen vorkommen und Autoantikörper gegen T-Helferzellen bei HIV-Infizierten häufiger sind als gegen zytotoxische T-Zellen. Daten von Sierp et al. weisen jedoch eine Autoantikörperbelastung für beide Subpopulationen der Lymphozyten nach (Sierp, persönliche Mitteilung), dies bei HIV+ Kindern. Die positive, signifikante Korrelation zwischen Phagozytose von CD4+ und CD8+ Zellen in der untersuchten Population (Abbildung 29, Seite 50) weist darauf hin, dass trotz unterschiedlicher medianer Phagozytoserate ein gemeinsamer kausaler Faktor bei der Phagozytoseinduktion vorhanden sein muss, der in der vorliegenden Dissertation aufgrund der oben vorgestellten Literatur in einem autoimmunen Geschehen mit Opsoninbeladung der Lymphozyten gesehen wird.

Die vergleichende Untersuchung von Phagozytose und Verlaufsparemtern der HIV-Infektion ließ einen sehr schwachen negativen Zusammenhang zwischen Viruslast und Phagozytose sowohl von T-Helferzellen als auch von zytotoxischen T-Zellen erkennen (Abbildung 30 und Abbildung 31, Seite 51), dies bei HIV-positiven Patienten mit einer Viruslast oberhalb der Nachweisgrenze. Von einer direkten Abhängigkeit zwischen Viruslast und Phagozytoserate wird aufgrund der gezeigten, schwachen Korrelation in dieser Untersuchung nicht ausgegangen. Korrelationen zwischen den beiden anderen gemessenen Verlaufsparemtern und der Phagozytoseaktivität fanden sich nicht. Hohe Viruslasten scheinen aber dennoch mit geringer Phagozytoseaktivität einher zu gehen (Abbildung 32 und Abbildung 33, Seite 52). Diese geminderte Phagozytoseaktivität könnte einerseits in einer funktionellen Schädigung der Makrophagen bei stark virämischen Patienten ihre Ursache haben, andererseits könnte aber auch die bei hoher Viruslast reduzierte T-Lymphozytenzahl zu geringerer Phagozytose führen. Patienten mit hoher Viruslast besitzen mehr HIV-infizierte Monozyten im peripheren Blut, was einen Funktionsdefekt und damit die verminderte Phagozytoseleistung erklären könnte (83). Ebenso ist die Apoptoserate der Monozyten/Makrophagen im untersuchten Kollektiv bei Infizierten signifikant erhöht (vgl. Abbildung 43, Seite 62), ein durch Apoptose bedingter Funktionsverlust eines wesentlichen Teiles der Makrophagenpopulation ist bei einer Apoptoserate von bis fast 100 % in vitro sehr wahrscheinlich (siehe Kapitel 4.4).

## 4.3 Validierung der Phagozytoserate

Parallel zur Untersuchung im Durchflusszytometer wurden die Böden der Zellkulturplatten, auf denen die mononukleären Zellen inkubiert worden waren, herausgetrennt, die dort noch haftenden Zellen nach Pappenheim gefärbt und unter dem Mikroskop auf Phagozytose von Lymphozyten durch Makrophagen ausgezählt. Dies sollte eine optische Erfolgskontrolle ermöglichen und die Phagozytoserate - analog des Verfahrens von M. C. Müller (80) auf Objektträgern - mit der im Durchflusszytometer gemessenen vergleichen.

Die im Mikroskop gefundene Phagozytose bei gesunden Kontrollen zeigt im Median annähernd gleich hohe Phagozytoseraten wie die Messung der Phagozytoserate im Durchflusszytometer. Die Hintergrundphagozytose bei gesunden Kontrollpersonen ohne Inkubation mit ATG beträgt auf den Böden der Zellkulturplatte 7 %, die mit ATG 13 % (Abbildung 34, Seite 53). Der Effekt von ATG bewirkt somit nahezu eine Verdoppelung der Phagozytoserate. Dennoch ließ sich kein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Test nachweisen. Die Spannweiten und Perzentilen beider Untergruppen (Kontrollen mit und ohne ATG) sind eindeutig größer als im zytometrischen Test (vgl. Abbildung 24, Seite 47). Im Streudiagramm (Abbildung 35, Seite 54) wird dies besonders deutlich: Trotz einer scheinbar positiven Korrelation ergibt sich durch mehrere Ausreißer hier nur ein Korrelationskoeffizient von  $r = 0,4$  und keine Signifikanz. Bei HIV-positiven Patienten ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Phagozytoserate im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigen. Obwohl die Spannweite größer ist, liegen die medianen Phagozytoseraten beide unter 10 % (Abbildung 36, Seite 54).

Der direkte Vergleich der im Durchflusszytometer und im Mikroskop ermittelten Phagozytoseraten bei HIV-positiven Patienten zeigt den schon beschriebenen unterschiedlichen Phagozytosegrad von CD4+ und CD8+ Zellen sowie einen signifikanten Unterschied zwischen mikroskopisch ermittelter Phagozytose von Lymphozyten und zytometrisch gemessener Phagozytose der beiden T-Zell-Subpopulationen (Abbildung 37, Seite 55). Die mikroskopisch und durchflusszytometrisch gefundenen Phagozytoseraten korrelieren signifikant miteinander (Abbildung 38, Seite 56). Daher wird in dieser Untersuchung von einer prinzipiell gegebenen Vergleichbarkeit der Messungen ausgegangen, obwohl die mikroskopische Auszählung nicht die signifikant erhöhte Phagozytoserate von Lymphozyten bei HIV-Infizierten belegte, die sich im zytometrischen Test zeigte.

Bei der Interpretation der obigen Ergebnisse und dem Vergleich mit den Zahlen von M. C. Müller (80) sollten folgende Punkte Berücksichtigung finden:

- M. C. Müller präparierte die mononukleären Zellen durch Lyse von Vollblut mit Ammoniumchlorid-Lyselösung. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll separiert.
- Die Inkubationsmethoden waren grundlegend verschieden. M. C. Müller inkubierte auf Objektträgern aus Glas in Plasma und RPMI 1640-Medium für 20 Stunden, in der hier vorliegenden Dissertation wurde auf rauheren Plastikböden in mit PBS verdünntem autologen Plasma für 8 Stunden inkubiert. Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ist stark von deren Adhärenz zum Oberflächenmaterial abhängig.
- M. C. Müller analysierte alle auf seinen Objektträgern vorhandenen Zellen. Die in dieser Untersuchung ausgewerteten Böden der Zellkulturplatten enthielten nur noch diejenigen Zellen, die sich durch vorsichtiges Abspülen und Entnehmen zur Analyse im Zytometer nicht vom Kunststoff der Böden lösen ließen. Daher rührte die um etwa den Faktor 10 niedrigere Zellzahl auf den Plattenböden nach der Entnahme für das Zytometer.

- M. C. Müller stratifizierte seine Patienten in schwach und stark IgG-beladen. Er konnte eine signifikant erhöhte Phagozytoserate bei stark IgG-beladenen Patienten gegenüber gesunden Kontrollen nachweisen, nicht jedoch bei schwach IgG-beladenen. Aus den unter 4.1 erwähnten Gründen wurde auf das Setzen eines solchen Trennwertes für die Unterteilung in schwach und stark IgG-beladen in dieser Untersuchung verzichtet und daher auch nicht nach einer derartigen Unterteilung hin analysiert.

Dass bei der Messung im Durchflusszytometer eventuell auch an Makrophagen adhärente Lymphozyten beim Durchgang durch den Laserstrahl als phagozytiert mitgemessen wurden, lässt sich aus den hier vorliegenden Daten nicht mit Sicherheit ausschließen. Die Auszählung im Mikroskop zeigte bei wenigen Patienten solche Zellhaufen aus Makrophagen und Lymphozyten, in denen die Lymphozyten (noch) außerhalb der Makrophagen lagen. Um eine Messung dieser Doubletten im Zytometer zuverlässig zu vermeiden, hätte das extrazelluläre Fluoreszenzsignal adhärenter Lymphozyten durch eine sogenannte Quenching-Substanz unterdrückt werden müssen. Es wird jedoch nicht von einem wesentlich die Messung verfälschenden Effekt durch solche Doubletten ausgegangen, da sie im Mikroskop nicht häufig waren.

Durch die parallele mikroskopische Auswertung wurde in der hier vorliegenden Dissertation nachgewiesen, dass die Makrophagen, die im Durchflusszytometer untersucht wurden, phagozytieren konnten, dass Phagozytose tatsächlich stattfand (siehe auch Abbildung 17, Seite 37) und dass die Messungen im Durchflusszytometer prinzipiell mit denen im Mikroskop vergleichbar sind. Obwohl die Zahlen von M. C. Müller aus seiner Dissertation nicht dem Wert nach reproduziert wurden, wurden seine Untersuchungen im Ergebnis bestätigt und es wurde erstmalig gezeigt, dass mehr CD4<sup>+</sup> Zellen als CD8<sup>+</sup> Zellen phagozytiert werden; hierbei sollte die Änderung des CD4/CD8-Ratios im Verlauf der Infektion mit berücksichtigt werden. Die unterschiedlichen Messwerte bei der mikroskopischen Phagozytosemessung der vorliegenden Untersuchung werden daher auf die verschiedenen Präparations- und Inkubationstechniken zurückgeführt.



## 4.4 Apoptose von Leukozyten

Die simultan mit der Phagozytose gemessene Apoptose der Leukozyten stellt den zweiten in dieser Dissertation untersuchten pathogenetischen Mechanismus der Lymphozytendepletion bei der HIV-Erkrankung dar. Gemessen wurde die Apoptose über die spezifische Anfärbung von auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen exprimiertem Phosphatidylserin mit FITC-markiertem Annexin-V als Liganden im Durchflusszytometer (97). Untersucht wurden CD4+ und CD8+ Lymphozyten sowie Monozyten/Makrophagen und NK-Zellen. Da die Messungen von Apoptose und Phagozytose bei Zellen aus der gleichen Ausbuchtung der Zellkulturplatte stammten, konnten beide Parameter miteinander in Beziehung gesetzt werden.

Bei der Validierung der Methode zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Apoptose bei gesunden Kontrollpersonen durch Inkubation mit ATG (Abbildung 39, Seite 58). Die medianen Apoptoseraten waren annähernd gleich (knapp unter 5 %), die mit ATG inkubierten Zellen besaßen jedoch die größere Spannweite. Das Streudiagramm der Apoptose nach Inkubation mit und ohne ATG bei gesunden Kontrollen (Abbildung 40, Seite 59) zeigt einen positiven linearen Zusammenhang, eine signifikante Korrelation ist nicht nachzuweisen. Die Zahl der untersuchten Kontrollpersonen war mit  $n = 8$  relativ gering, der Ausreißer fällt damit stark ins Gewicht. Ohne den Ausreißer kann von einer Korrelation ausgegangen werden, wie die eingefügte Korrelationsgerade in Abbildung 40 (Seite 59) zeigt. Die Apoptose von CD8+ Zellen gesunder Kontrollen zeigte ähnliche Werte wie die der CD4+ Zellen gesunder Kontrollen (nicht dargestellt). Die beiden Abbildungen lassen den Schluss zu, dass ATG nicht als Apoptoseinduktor wirksam ist, und, da die Verwendung von ATG als Modell für die Opsonierung mit Autoantikörpern gilt, auch die Immunglobulinbeladung - dem Modell nach - nicht in vermehrter Apoptose resultiert. M. C. Müller (80) fand in seiner Dissertation eine signifikant erhöhte Apoptoserate durch Inkubation mit ATG bei gesunden Kontrollen und schloss auf eine vermehrte Phagozytose der apoptotischen Zellen. Dies lässt sich durch die soeben dargestellten Befunde nicht sicher stützen.

Die T-Helferzellen der HIV-positiven Patienten zeigen eine signifikante Erhöhung ihrer medianen Apoptose auf fast den dreifachen Wert (Abbildung 41, Seite 60) gegenüber den gesunden Kontrollen. Zytotoxische T-Zellen von Infizierten hingegen gehen zwar mehr als doppelt so häufig in Apoptose über als die der Gesunden, diese Erhöhung ist jedoch statistisch nicht signifikant (Abbildung 42, Seite 61). Dies ist gut mit einer Untersuchung von Prati et al. vereinbar (86). Sie untersuchten die Apoptose von Lymphozyten (nicht unterteilt in Subpopulationen) an einem großen Kollektiv in einer Querschnittstudie ( $n = 101$  Patienten) und longitudinal bei 18 Patienten. Sie fanden eine stadienabhängig signifikant erhöhte Apoptose von Lymphozyten bei HIV-Patienten gegenüber Gesunden. Die gesteigerte Apoptose war mit den Zahlen von CD4+ und CD8+ Zellen im peripheren Blut negativ korreliert.

Einen sehr auffälligen Befund zeigt der Vergleich von Apoptoseraten bei Monozyten/Makrophagen HIV-infizierter Personen und gesunder Kontrollen. Die basale Apoptoserate der Kontrollpersonen liegt bei ca. 20 %, die der HIV-Patienten signifikant erhöht bei 60 % (Abbildung 43, Seite 62). Zum Vergleich: Bei Lymphozyten fand sich eine Hintergrundapoptose von deutlich unter 10 %. Literatur über die Apoptose von Monozyten bzw. Makrophagen, die sich zur Diskussion dieses Befundes eignen würde, fand sich trotz ausgiebiger Literaturrecherche nicht. Die aktuelle Forschung scheint sich mehr auf molekularbiologische Mechanismen der Apoptoseinduktion bei Lymphozyten zu konzentrieren (siehe auch 1.2.5). Lum et al. wiesen für aus Monozyten entstandene Makrophagen nach, dass eine Apoptoseinduktion über das TRAIL/APO 2-L-System möglich ist (68). Dies ist jedoch nur bei Zellen HIV-Infizierter oder bei in vitro mit dem HIV infizierten Zellen erfolgreich, bei Zellen nicht-

infizierter Personen ist dieser Weg der Apoptoseinduktion versperrt. Die erhöhte Apoptose ließe sich damit indirekt erklären, akzeptiert man das Vorkommen von TNF in den untersuchten Proben (Nachweis nicht erfolgt). Über die erhöhte Apoptose von Makrophagen ließe sich auch die unter 4.2 gefundene verminderte Phagozytoserate bei erhöhter Viruslast erklären. Der Einfluss der achtstündigen Inkubation trägt sicher auch mit zu einer erhöhten Spontana-poptose bei: Die Inkubation auf Platten mit rauer Plastikoberfläche, die statt der Stimulierung mit löslichen Pyrogenen eine Differenzierung in Makrophagen bewirken soll, kann allein schon zum Absterben der Zellen beitragen (siehe auch 3.3.4).

Im Gegensatz zu CD4-tragenden Zielzellen der HIV-Infektion wie Lymphozyten oder Monozyten scheinen NK-Zellen infizierter Personen nicht häufiger in Apoptose überzugehen als die der gesunden Kontrollpersonen, obwohl sich auch hier eine größere Spannweite der Apoptoserate bei den Zellen HIV-Infizierter zeigt (Abbildung 44, Seite 63). Über die Apoptose von NK-Zellen fand sich keine Literatur, es ist jedoch bekannt, dass die lytische Aktivität der NK-Zellen bei hoher Viruslast abnimmt (100). Unterschiede in der antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität fanden sich dort nicht, ein Funktionsverlust während der HIV-Infektion gilt aber als sicher.

Der zusammenfassende Vergleich der Apoptoseraten der untersuchten Populationen in Abbildung 45 (Seite 64) zeigt bis auf die Apoptoseraten von CD4+ und CD8+ Zellen signifikante Unterschiede bei den Subpopulationen. Für die erhöhte Apoptose von Lymphozyten werden sowohl das Fas/FasL-System als auch das TRAIL/APO 2-L-System (93, 50, 57) verantwortlich gemacht, deren Rezeptoren auf Oberflächen von Lymphozyten hoch reguliert werden. Sloand et al. fanden eine erhöhte Expression des Fas-Rezeptors auf CD4+ und CD8+ Zellen HIV-Infizierter und stellten fest, dass CD4+ Zellen mehr Fas-vermittelte Apoptose zeigten. Das Plasma der Patienten besaß zudem deutlich erhöhte FasL-Spiegel (50). Diese Befunde lassen sich gut mit den in der vorliegenden Dissertation ermittelten Apoptoseraten bei Lymphozyten in Einklang bringen.

Neben infizierten Zellen sind es auch nicht-infizierte Zellen (sowohl Lymphozyten als auch Monozyten), die einen apoptotischen Zelltod sterben können (68). Nur wenige der im peripheren Blut vorhandenen CD4+ Zellen sind wirklich infiziert, viele sterben einen durch fremde Zellen (CD8+ T-Zellen oder Makrophagen) ausgelösten Tod in der Apoptose. Erst Untersuchungen, die mittels aufwändiger mathematischer Verfahren die Kinetik der T-Zell-Homöostase verständlich gemacht haben, zeigten die erhöhten Raten der Proliferation und des Zelltodes der Lymphozyten (76). Dadurch wird deutlich, dass die Mechanismen, die für den Abfall der Lymphozytenzahlen verantwortlich sind - gleich welcher Genese - über den CD4-Tropismus des HIV hinausgehen müssen. Die Lymphozytensubpopulationen sollten daher auch in weitergehenden Untersuchungen zur Immunpathogenese bzw. der CD4-Depletion immer getrennt voneinander analysiert werden.

Eine Untersuchung von Aceituno et al. wies eine Apoptoseinduktion durch zirkulierende, freie Immunkomplexe bei aktivierten Lymphozyten HIV-Infizierter nach (1). Eine Assoziation zwischen Immunglobulinbeladung und Apoptose wird durch die in dieser Dissertation vorliegenden Daten nicht belegt.

## 4.5 Vergleich von Apoptose und Phagozytose bei Lymphozyten

Eines der in der Fragestellung formulierten Ziele dieser Dissertation war es, dem in wesentlichen Zügen akzeptierten Modell der Apoptose als pathogenetischem Mechanismus der CD4-Depletion die Phagozytose von Lymphozyten als neuen, kaum untersuchten Faktor gegenüberzustellen.

Den direkten Vergleich von Phagozytose und Apoptose bei HIV-positiven Patienten zeigt die Abbildung 46 bzw. die Abbildung 47 (Seite 65). Hier wurden in Streudiagrammen die Phagozytose- und Apoptoseraten von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen gegenübergestellt. Für beide untersuchte Populationen ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen Apoptose und Phagozytose. Daher wird in dieser Dissertation von zwei unabhängigen pathogenetischen Mechanismen der Lymphozytendepletion ausgegangen. Die Untersuchung von M. C. Müller (80) gelangte zum gleichen Ergebnis. Auch dort ließen sich keine Korrelationen zwischen Phagozytose und Apoptose ermitteln.

Das Auftreten von Phosphatidylserin auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen stellt einen Phagozytosereiz für Makrophagen dar. Bedingt durch die suboptimale Umgebung für diese Zellen in der Plastikausbuchtung der Zellkulturplatte könnte die Phagozytoseaktivität gemindert sein und so die Kausalkette Apoptose => Phosphatidylserinexpression => Phagozytose nicht in der theoretisch zu erwartenden Intensität und Effektivität ablaufen. Ebenso könnten zirkulierende Immunkomplexe durch ihre Anheftung an Zelloberflächen die durch Phosphatidylserin vermittelte Apoptose hemmen. Die Inkubation über acht Stunden und die darauf folgende Analyse wurden zwar experimentell als guter Kompromiss ermittelt, bieten jedoch nur Einblick in ein relativ kleines Zeitfenster ex vivo. Die Zahl toter Zellen in der Messung der Apoptose bei Inkubationszeiten von deutlich mehr als 12 Stunden nahm überproportional zu, die basale Phagozytose der Kontrollen stieg ebenfalls deutlich an (die Daten sind unter Ergebnisse nicht dargestellt). Daraus resultierte die achtsündige Inkubation. Ein Verlaufsuntersuchung der Apoptose von Lymphozyten über mehr als 24 Stunden wäre sich möglich, eine Parallelmessung der Phagozytose mit dem vorliegenden Assay ist aus den genannten Gründen jedoch nicht praktikabel.

Obwohl apoptotische Zellen von Makrophagen durch Phagozytose beseitigt werden (65), scheint die Schlussfolgerung nicht zu gelten, dass die Durchflusszytometer gemessene Phagozytose lediglich das Epiphänomen einer abgelaufenen Apoptose war.

Die Autoantikörper- bzw. Komplementbeladung, die als starker Phagozytoseinduktor bei der Lymphozytendepletion gesehen werden können, haben ein autoimmunes Pendant im LE-Phänomen des SLE mit der Phagozytose von autoantikörperbeladenen Zellen (10, 103) und in der HIV-Thrombopenie (11). Das LE-Phänomen tritt bei Patienten auf, die hohe Titer antinukleärer Antikörper im Blut besitzen, die mit diesen antinukleären Antikörpern beladenen Zellkerne werden in toto von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen phagozytiert (Bildung von LE-Zellen). Ferner wurde bei diesen Patienten mit systemischem Lupus erythematoses eine Korrelation zwischen antilymphozytären Antikörpern und einer Lymphopenie gefunden (103). Die HIV-Thrombopenie scheint, zumindest zum Teil, ebenfalls durch Autoantikörper vermittelt zu sein (11). Diese Phänomene zeigen, dass eine autoimmune Komponente bei den genannten Erkrankungen an der Pathogenese beteiligt ist und dass unterschiedlich große Zellen und Zellbestandteile phagozytiert werden können (ganze Zellen, Zellkerne, Thrombozyten).

## 4.6 Schlussfolgerung

Die Mechanismen des Abfalles der T-Lymphozytenzahl bei der HIV-Infektion sind Gegenstand intensiver Forschungsanstrengungen und werden kontrovers diskutiert. In dieser Dissertation wurden zwei pathogenetische Faktoren der Lymphozytendepletion miteinander verglichen: Phagozytose und Apoptose.

Zur Ermittlung der Phagozytose von Lymphozyten durch autologe Makrophagen wurde ein neuer in-vitro-Test entwickelt, der erstmalig die Messung großer Zellzahlen getrennt nach Lymphozytensubpopulationen im Durchflusszytometer ermöglichte. Dieser Test erwies sich in der durch diese Dissertation durchgeführten Evaluation als zuverlässig, aber präparativ und zeitlich recht aufwändig.

Die Ergebnisse dieser Dissertation bestätigen den Abfall der Helferzellzahl und den Anstieg der Autoantikörperbeladung im Verlauf der Infektion, wie er schon mehrfach publiziert wurde. In dieser Autoantikörperbeladung und dem damit verbundenen Phagozytosereiz für Makrophagen wird der Grund für die nachgewiesene signifikant erhöhte Phagozytose von Lymphozyten bei HIV-Infizierten gesehen. Hohe Viruslasten scheinen zudem mit einem Funktionsdefekt der Makrophagen einher zu gehen, der sich in verminderter Phagozytoseleistung äußert (siehe Seite 52).

Die erhöhte Apoptose betrifft vor allem CD4<sup>+</sup> Zellen und Monozyten/Makrophagen der HIV-infizierten Patienten. Die Untersuchung zeigte erstmalig eine stark erhöhte Apoptoserate der Monozyten/Makrophagenpopulation, die nicht allein durch die Bedingungen bei der Inkubation und Präparation erklärt werden kann. Von anderen Autoren publizierte Ergebnisse zur Apoptose von Lymphozyten konnten im Wesentlichen bestätigt werden.

Durch die fehlende Korrelation bei der vergleichenden Analyse von Phagozytose und Apoptose (Abbildung 46 und Abbildung 47, Seite 65) wird hier die These vertreten, dass es sich um zwei voneinander unabhängige Mechanismen handelt, die beide zum Verlust von Lymphozyten bei der HIV-Infektion beitragen.

Die Ergebnisse der differenzierte Analyse der Subpopulationen der Lymphozyten, sowohl bei der Phagozytose- als auch bei der Apoptosemessung, lassen sich gut in den momentanen Stand der Forschung einordnen. Es bleibt aber festzustellen, dass bei vielen molekulargenetischen Untersuchungen zur Apoptoseinduktion bei der HIV-Infektion der Bezug zur Klinik nicht ausreichend hergestellt, sondern nur auf molekularbiologischer Ebene argumentiert wird. Es wurde versucht, die beiden untersuchten Phänomene miteinander in Bezug zu setzen und in den Verlauf der Erkrankung zu integrieren. Die Grenzen, die eine derartige Querschnittsuntersuchung mit  $n = 49$  (Phagozytosemessung) und  $n = 20$  Patienten (Apoptosemessung) besitzt, sind dabei eng gesetzt.

Longitudinale Untersuchungen sollten die Veränderung der gemessenen Parameter im individuellen Verlauf der jeweiligen Patienten besser darstellen können. Eine leichtere Extrapolation auf die CDC-Stadien der HIV-Infektion und auf die Einteilung in typical progressors, rapid progressors, long-term survivors und long-term nonprogressors (82), somit Aussagen über den prognostischen Wert von Apoptose- und Phagozytosemessung, lassen eine Fortführung der Untersuchungen über einen mittelfristigen Zeitraum (24-48 Monate) lohnenswert erscheinen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Mechanismen des Verlustes von T-Lymphozyten im Verlauf der HIV-Infektion sind nicht abschließend geklärt und Gegenstand kontroverser Diskussion. Der Abfall der Zahl von T-Helferzellen im peripheren Blut korreliert mit erhöhter Autoantikörper- bzw. Immunkomplexbelastung (IgG, IgM, gp120, Komplementfaktoren) und gesteigerter Apoptoserate. Die Elimination immunkomplexbelasteter Lymphozyten aus dem Kreislauf durch Makrophagen, die die opsonierten Lymphozyten phagozytieren, wurde durch M. C. Müller erstmalig im Jahre 1999 in seiner Dissertation im Lichtmikroskop nachgewiesen. In der hier vorliegenden Querschnittstudie wurden Phagozytose und Apoptose von Lymphozyten vergleichend durch Messung im Durchflussszytometer untersucht und mit Verlaufsparametern der HIV-Infektion in Bezug gesetzt, um die Rolle von Apoptose und Phagozytose in der Pathogenese der HIV-Erkrankung zu ermitteln.

Im peripheren Blut von HIV-Infizierten wurden CD4-Zellzahl und Antikörperbelastung durchflussszytometrisch, die Viruslast mittels bDNA-Test quantitativ ermittelt. Zur Messung der Phagozytose von Lymphozyten durch autologe Makrophagen wurde ein neuer in-vitro-Test für das Durchflussszytometer mit intrazellulärer Anfärbung von Lymphozytenmarkern entwickelt. Als Positivkontrolle und Modell zur Opsoninbelastung der Lymphozyten diente die Inkubation mit Antithymozytenglobulin (ATG). Die Phagozytose wurde zusätzlich noch lichtmikroskopisch gemessen. Die Messung der Apoptose erfolgte durch Anfärbung von Phosphatidylserin auf der Membranaußenseite apoptotischer Zellen mit Annexin-V-FITC, Gegenfärbung toter Zellen mit 7-Aminoactinomycin D und Analyse im Durchflussszytometer.

Untersucht wurden insgesamt 49 HIV-positive Patienten aller CDC-Stadien und 11 gesunde Kontrollpersonen. Es zeigten sich ein deutlicher Verlust von CD4<sup>+</sup> Zellen und eine signifikante Erhöhung der IgG-Beladung von T-Helferzellen bei HIV-positiven Patienten im Verlauf der Infektion gegenüber gesunden Kontrollpersonen. Die durchflussszytometrisch gemessene Phagozytoserate von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen war bei Infizierten gegenüber Kontrollen signifikant erhöht, wobei signifikant mehr CD4<sup>+</sup> als CD8<sup>+</sup> Zellen bei HIV-Patienten phagozytiert wurden. HIV-positive Patienten mit hoher Viruslast phagozytierten signifikant weniger CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen als Patienten mit geringer Virämie. Bei der Messung der Apoptose (n = 20 Patienten und n = 8 Kontrollen) stellte sich eine signifikant erhöhte Apoptoserate von CD4<sup>+</sup> Zellen und von aus Monozyten abgeleiteten Makrophagen bei HIV-Positiven heraus. Für CD8<sup>+</sup> Zellen und NK-Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die Apoptoseren von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen korrelierten nicht mit den Phagozytoseraten.

T-Zell-spezifische Immunkomplexe auf Lymphozyten stellen einen häufigen Befund bei HIV-Infizierten dar. Die Phagozytose von derart opsonierten T-Lymphozyten durch autologe Makrophagen wurde in dieser Querschnittstudie erstmalig im Durchflussszytometer nachgewiesen und quantifiziert. Die Ermittlung von Apoptoseren bestätigte von anderen Autoren publizierte Ergebnisse. Aufgrund der hier gezeigten Befunde kann von Phagozytose und Apoptose als zwei getrennten pathogenetischen Mechanismen zur Lymphozytendepletion bei der HIV-Erkrankung ausgegangen werden. Sowohl in der Phagozytosemessung als auch in der Untersuchung der Apoptose stellen sich die jeweiligen Zellpopulationen sehr different

dar, so dass weitergehende longitudinale Studien nicht nur den Verlust von T-Helferzellen zum Gegenstand haben, sondern vor allem CD8+ Zellen und Monozyten miterfassen sollten.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Aceituno E, Castanon S, Jimenez C, Subira D, De Gorgolas M, Fernandez-Guerrero M, Ortiz F, Garcia R (1997)  
Circulating immune complexes from HIV-1+ patients induces apoptosis on normal lymphocytes.  
Immunology 92: 317-320
- (2) Adler MW (2001)  
ABC of Aids: Development of the epidemic.  
Br Med J 322: 1226-1229
- (3) Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA (1996)  
CCR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1.  
Science 272: 1955-1958
- (4) Ameisen JC, Capron A (1991)  
Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis.  
Immunol Today 12: 102-105
- (5) Ashorn P, McQuade TJ, Thaisrivongs S, Tomasselli AG, Tarpley WG, Moss B (1990)  
An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection.  
Proc Natl Acad Sci U S A 87: 7472-7476
- (6) Banda NK, Bernier J, Kurahara DK, Kurre R, Haigwood N, Sekaly RP, Finkel TH (1992)  
Crosslinking CD4 by human immunodeficiency virus gp120 primes T cells for activation-induced apoptosis.  
J Exp Med 176: 1099-1106
- (7) Baqui AA, Meiller TF, Zhang M, Falkle WA Jr (1999)  
The effects of HIV viral load on the phagocytic activity of monocytes activated with lipopolysaccharide from oral microorganisms.  
Immunopharmacol Immunotoxicol 21: 421-438
- (8) Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983)  
Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).  
Science 220: 868-871

- (9) Bartz SR, Emerman M (1999)  
Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by up-regulating FLICE/caspase-8.  
J Virol 73: 1956-1963
- (10) Bauer R, Schutz R (1979)  
Nucleophagocytosis in monocytes--an immunocytologic phenomenon of anti-dna-antibodies.  
Hautarzt 30: 134-139
- (11) Bettaieb A, Oksenhendler E, Duedari N, Bierling P (1996)  
Cross-reactive antibodies between HIV-gp120 and platelet gpIIIa (CD61) in HIV-related immune thrombocytopenic purpura.  
Clin Exp Immunol 103: 19-23
- (12) Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ (2001)  
Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection.  
J Virol 75: 11983-11991
- (13) Bock HA, Gallati H, Zurcher RM, Bachofen M, Mihatsch MJ, Landmann J, Thiel G (1995)  
A randomized prospective trial of prophylactic immunosuppression with ATG-fresenius versus OKT3 after renal transplantation.  
Transplantation 59: 830-840
- (14) Bossy-Wetzel E, Green DR (1999)  
Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors.  
J Biol Chem 274: 17484-17490
- (15) Capon DJ, Ward RH (1991)  
The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis.  
Annu Rev Immunol 9: 649-678
- (16) Centers for Disease Control and Prevention (1981)  
Pneumocystis pneumonia - Los Angeles.  
Morb Mortal Wkly Rep 30: 250-252
- (17) Centers for Disease Control and Prevention (1981)  
Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City and California.  
Morb Mortal Wkly Rep 30: 305-308
- (18) Centers for Disease Control and Prevention (1982)  
A cluster of Kaposi's sarcoma and Pneumocystis carinii pneumonia among homosexual male residents of Los Angeles and Orange Counties, California.  
Morb Mortal Wkly Rep 31: 305-307



- (19) Centers for Disease Control and Prevention (1982)  
Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California.  
Morb Mortal Wkly Rep 31: 652-654
- (20) Centers for Disease Control and Prevention (1992)  
1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults.  
Morb Mortal Wkly Rep 41: 1-19
- (21) Centers for Disease Control and Prevention (1997)  
1997 revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV).  
Morb Mortal Wkly Rep 46: 1-29
- (22) Centers for Disease Control and Prevention (2001)  
Revised guidelines for HIV counseling, testing, and referral.  
Morb Mortal Wkly Rep 50 RR-19: 1-57
- (23) Constantine NT, van der Groen G, Belsey EM, Tamashiro H (1994)  
Sensitivity of HIV-antibody assays determined by seroconversion panels.  
AIDS 8: 1715-1720
- (24) Corbitt G, Bailey AS, Williams G (1990)  
HIV infection in Manchester, 1959.  
Lancet 336: 5-1
- (25) Cossel L (1977)  
Phagocytosis of lymphocytes in the orthopic porcine liver homograft.  
Zentralbl Allg Pathol 121: 481-488
- (26) Dagleish AG (1995)  
Autoimmune mechanisms of depletion of CD4 cells in HIV infection.  
Br J Haematol 91: 525-534
- (27) Daniel V, Melk A, Süsal C, Weimer R, Zimmermann R, Huth-Kühne A, Opelz G (1999)  
CD4 depletion in HIV-infected haemophilia patients is associated with rapid clearance of immune complex-coated CD4+ lymphocytes.  
Clin Exp Immunol 115: 477-484
- (28) Daniel V, Süsal C, Weimer R, Zimmermann R, Huth-Kühne A, Opelz G (1993)  
Association of T cell and macrophage dysfunction with surface gp 120-immunoglobulin-complement complexes in HIV-infected patients.  
Clin Exp Immunol 93: 152-156
- (29) Daniel V, Süsal C, Weimer R, Zipperle S, Kropelin M, Zimmermann R, Huth-Kühne A, Gerhard I, Maier H, Opelz G (1996)  
CD8+ lymphocyte decrease in HIV disease: association with anti-CD4+ but not with anti-CD8+ lymphocyte autoantibodies.  
Vox Sang 70: 86-91

- 
- (30) Daniel V, Süsal C, Weimer R, Zipperle S, Kropelin M, Zimmermann R, Huth-Kühne A, Opelz G (1996)  
Association of T cell dysfunction with the presence of IgG autoantibodies on CD4+ lymphocytes in haemophilia patients; results of a 10-year study.  
Clin Exp Immunol 104: 4-10
- (31) Daniel V, Süsal C, Weimer R, Zipperle S, Kropelin M, Zimmermann R, Huth-Kühne A, Opelz G (1995)  
Sequential occurrence of IgM, IgM/IgG, and gp120-IgM/IgG complement complexes on CD4+ lymphocytes in relation to CD4+ blood lymphocyte depletion in HIV+ haemophilia patients: results of a 10-year study.  
Immunol Lett 47: 97-102
- (32) Darnay BG, Aggarwal BB (1997)  
Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations.  
J Leukoc Biol 61: 559-566
- (33) Dobmeyer TS, Raffel B, Dobmeyer JM, Findhammer S, Klein SA, Kabelitz D, Hoelzer D, Helm EB, Rossol R (1995)  
Decreased function of monocytes and granulocytes during HIV-1 infection correlates with CD4 cell counts.  
Eur J Med Res 1: 9-15
- (34) Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA (1996)  
HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor.  
Science 272: 872-877
- (35) Fleury S, Rizzardi GP, Chapuis A, Tambussi G, Knabenhans C, Simeoni E, Meuwly JY, Corpataux JM, Lazzarin A, Miedema F, Pantaleo G (2000)  
Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy.  
Proc Natl Acad Sci U S A 97: 5393-5398
- (36) Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B (1984)  
Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS.  
Science 224: 500-503
- (37) Garcia JV, Miller AD (1992)  
Downregulation of cell surface CD4 by nef.  
Res Virol 143: 52-55
- (38) Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC (1992)  
Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals.  
J Exp Med 175: 331-340

- 
- (39) HIV Surrogate Marker Collaborative Group (2000)  
Human immunodeficiency virus type 1 RNA level and CD4 count as prognostic markers and surrogate end points: a meta-analysis.  
*AIDS Res Hum Retroviruses* 16: 1123-1133
- (40) Hahn BH, Shaw GM, De Cock KM, Sharp PM (2000)  
AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications.  
*Science* 287: 607-614
- (41) Han X, Becker K, Degen HJ, Jablonowski H, Strohmeyer G (1996)  
Synergistic stimulatory effects of tumour necrosis factor alpha and interferon gamma on replication of human immunodeficiency virus type 1 and on apoptosis of HIV-1-infected host cells.  
*Eur J Clin Invest* 26: 286-292
- (42) Harris C, Small CB, Klein RS, Friedland GH, Moll B, Emeson EE, Spigland I, Steigbigel NH (1983)  
Immunodeficiency in female sexual partners of men with the acquired immunodeficiency syndrome.  
*N Engl J Med* 308: 1181-1184
- (43) Hatano H, Vogel S, Yoder C, Metcalf JA, Dewar R, Davey RT Jr, Polis MA (2000)  
Pre-HAART HIV burden approximates post-HAART viral levels following interruption of therapy in patients with sustained viral suppression.  
*AIDS* 14: 1357-1363
- (44) Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune JM (1999)  
Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans.  
*Nat Med* 5: 83-89
- (45) Henrard DR, Daar E, Farzadegan H, Clark SJ, Phillips J, Shaw GM, Busch MP (1995)  
Virologic and immunologic characterization of symptomatic and asymptomatic primary HIV-1 infection.  
*J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 9: 305-310
- (46) Herbein G, Van Lint C, Lovett JL, Verdin E (1998)  
Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes.  
*J Virol* 72: 660-670
- (47) Ho BC, Laudette-Aboulhab J, Se-Thoe SY, Chan SP, Ling AE, Leo YS (2000)  
Correlation of baseline quantitative plasma human immunodeficiency (HIV) type 1 RNA viral load with clinical status and CD4+ T-cell counts in treatment-naïve HIV-positive patients in Singapore.  
*Ann Acad Med Singapore* 29: 708-713
- (48) Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M (1995)  
Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection.  
*Nature* 373: 123-126

- 
- (49) Hober D, Haque A, Wattré P, Beaucaire G, Mouton Y, Capron A (1989)  
Production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-1 (IL-1) in patients with AIDS. Enhanced level of TNF-alpha is related to a higher cytotoxic activity.  
Clin Exp Immunol 78: 329-333
- (50) Hosaka N, Oyaizu N, Kaplan MH, Yagita H, Pahwa S (1998)  
Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons.  
J Infect Dis 178: 1030-1039
- (51) Hymes KB, Cheung T, Greene JB, Prose NS, Marcus A, Ballard H, William DC, Laubenstein LJ (1981)  
Kaposi's sarcoma in homosexual men-a report of eight cases.  
Lancet 2: 598-600
- (52) Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J (1997)  
Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP.  
Nature 388: 190-195
- (53) Iuliano R, Forastieri G, Brizzi M, Mazzotta F, Ceccherini-Nelli L (1995)  
HIV-plasma viral load detection by branched DNA signal amplification.  
New Microbiol 18: 299-301
- (54) Janeway CA, Travers P (1997)  
Grundbegriffe der Immunologie, 1-30.  
In: Janeway CA, Travers P: Immunologie.  
2. Aufl., Spektrum Akad. Verl. GmbH, Heidelberg.
- (55) Janeway CA, Travers P (1997)  
Die T-Zell-vermittelte Immunität, 241-284.  
In: Janeway CA, Travers P: Immunologie.  
2. Aufl., Spektrum Akad. Verl. GmbH, Heidelberg.
- (56) Janeway CA, Travers P (1997)  
Die humorale Immunantwort, 285-338.  
In: Janeway CA, Travers P: Immunologie.  
2. Aufl., Spektrum Akad. Verl. GmbH, Heidelberg.
- (57) Jeremias I, Herr I, Boehler T, Debatin KM (1998)  
TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells.  
Eur J Immunol 28: 143-152
- (58) Kahn JO, Walker BD (1998)  
Acute human immunodeficiency virus type 1 infection.  
N Engl J Med 339: 33-39
- (59) Katz RA, Skalka AM (1990)  
Generation of diversity in retroviruses.  
Annu Rev Genet 24: 409-445

- 
- (60) Katzenstein TL, Pedersen C, Nielsen C, Lundgren JD, Jakobsen PH, Gerstoft J (1996)  
Longitudinal serum HIV RNA quantification: correlation to viral phenotype at sero-conversion and clinical outcome.  
AIDS 10: 167-173
- (61) Kilby JM (2001)  
Human immunodeficiency virus pathogenesis: insights from studies of lymphoid cells and tissues.  
Clin Infect Dis 33: 873-884
- (62) Kim SY, Byrn R, Groopman J, Baltimore D (1989)  
Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression.  
J Virol 63: 3708-3713
- (63) Koprowski H (1992)  
AIDS and the polio vaccine.  
Science 257: 1024
- (64) Korber B, Brande, C, Haynes B, Koup R, Kuiken C, Moore JP, Walker BD, Watkins DI (1999)  
HIV Molecular Immunology 1999.  
Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA, 492-505
- (65) Kornbluth RS (1994)  
The immunological potential of apoptotic debris produced by tumor cells and during HIV infection.  
Immunol Lett 43: 125-132
- (66) Lemp GF, Hirozawa AM, Cohen JB, Derish PA, McKinney KC, Hernandez SR (1992)  
Survival for women and men with AIDS.  
J Infect Dis 166: 74-79
- (67) Longobardi-Givan AL (1992)  
Flow cytometry: first principles.  
Wiley-Liss, Inc., New York, NY, USA, 15-101
- (68) Lum JJ, Pilon AA, Sanchez-Dardon J, Phenix BN, Kim JE, Mihowich J, Jamison K, Hawley-Foss N, Lynch DH, Badley AD (2001)  
Induction of cell death in human immunodeficiency virus-infected macrophages and resting memory CD4 T cells by TRAIL/Apo2l.  
J Virol 75: 11128-11136
- (69) Marechal V, Prevost MC, Petit C, Perret E, Heard JM, Schwartz O (2001)  
Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry into Macrophages Mediated by Macropinocytosis.  
J Virol 75: 11166-11177
- (70) Martin B (2001)  
The burden of proof and the origin of acquired immune deficiency syndrome.  
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 356: 939-943

- 
- (71) McCloskey TW, Oyaizu N, Kaplan M, Pahwa S (1995)  
Expression of the Fas antigen in patients infected with human immunodeficiency virus.  
Cytometry 22: 111-114
- (72) McCune JM (2001)  
The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease.  
Nature 410: 974-979
- (73) Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA (1996)  
Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma.  
Science 272: 1167-1170
- (74) Miller MD, Warmerdam MT, Gaston I, Greene WC, Feinberg MB (1994)  
The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages.  
J Exp Med 179: 101-113
- (75) Mindel A, Tenant-Flowers M (2001)  
ABC of AIDS: Natural history and management of early HIV infection.  
Br Med J 322: 1290-1293
- (76) Mohri H, Perelson AS, Tung K, Ribeiro RM, Ramratnam B, Markowitz M, Kost R, Hurley A, Weinberger L, Cesar D, Hellerstein MK, Ho DD (2001)  
Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy.  
J Exp Med 194: 1277-1287
- (77) Musey L, Hughes J, Schacker T, Shea T, Corey L, McElrath MJ (1997)  
Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection.  
N Engl J Med 337: 1267-1274
- (78) Mylonakis E, Paliou M, Lally M, Flanigan TP, Rich JD (2000)  
Laboratory testing for infection with the human immunodeficiency virus: established and novel approaches.  
Am J Med 109: 568-576
- (79) Müller C, Kukel S, Bauer R (1994)  
Antibodies against CD4+ lymphocytes in plasma of HIV-infected patients are related to CD4 cell depletion in vivo.  
Immunol Lett 41: 163-167
- (80) Müller MC (1999)  
Die Bedeutung von antilymphozytären Antikörpern in der Immunpathogenese der HIV-Erkrankung bei Erwachsenen sowie bei Kindern HIV-positiver Mütter.  
Med. Dissertation, Univ. Heidelberg
- (81) Orenstein JM (2000)  
In vivo cytolysis and fusion of human immunodeficiency virus type 1-infected lymphocytes in lymphoid tissue.  
J Infect Dis 182: 338-342

- 
- (82) Pantaleo G, Fauci AS (1996)  
Immunopathogenesis of HIV infection.  
Annu Rev Microbiol 50: 825-854
- (83) Patterson BK, Mosiman VL, Cantarero L, Furtado M, Bhattacharya M, Goolsby C (1998)  
Detection of HIV-RNA-positive monocytes in peripheral blood of HIV-positive patients by simultaneous flow cytometric analysis of intracellular HIV RNA and cellular immunophenotype.  
Cytometry 31: 265-274
- (84) Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD (1993)  
High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR.  
Science 259: 1749-1754
- (85) Pietrella D, Monari C, Retini C, Palazzetti B, Bistoni F, Vecchiarelli A (1998)  
Human immunodeficiency virus type 1 envelope protein gp120 impairs intracellular antifungal mechanisms in human monocytes.  
J Infect Dis 177: 347-354
- (86) Prati E, Gorla R, Malacarne F, Airo P, Brugnoli D, Gargiulo F, Tebaldi A, Castelli F, Carosi G, Cattaneo R (1997)  
Study of spontaneous apoptosis in HIV+ patients: correlation with clinical progression and T cell loss.  
AIDS Res Hum Retroviruses 13: 1501-1508
- (87) Robert Koch-Institut (2001)  
HIV/AIDS-Bericht I/2001.  
Epidemiologisches Bulletin, Sonderausgabe B, Robert Koch-Institut, Berlin
- (88) Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseltine WA, Rosen CA (1989)  
Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein.  
J Virol 63: 1-8
- (89) Sakai H, Kawamura M, Sakuragi J, Sakuragi S, Shibata R, Ishimoto A, Ono N, Ueda S, Adachi A (1993)  
Integration is essential for efficient gene expression of human immunodeficiency virus type 1.  
J Virol 67: 1169-1174
- (90) Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Kramer PH, Peter ME (1998)  
Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.  
EMBO J 17: 1675-1687

- 
- (91) Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM (1996)  
Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein.  
Nat Med 2: 338-342
- (92) Skowron G, Street JC, Obee EM (2001)  
Baseline CD4(+) cell count, not viral load, correlates with virologic suppression induced by potent antiretroviral therapy.  
J Acquir Immune Defic Syndr 28: 313-319
- (93) Sloan EM, Young NS, Kumar P, Weichold FF, Sato T, Maciejewski JP (1997)  
Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication.  
Blood 89: 1357-1363
- (94) Stewart SA, Poon B, Jowett JB, Chen IS (1997)  
Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest.  
J Virol 71: 5579-5592
- (95) Sun J, Barbeau B, Sato S, Boivin G, Goyette N, Tremblay MJ (2002)  
Syncytium formation and HIV-1 replication are both accentuated by purified influenza and virus-associated neuraminidase.  
J Biol Chem 277: 9825-9833
- (96) UNAIDS/WHO (2001)  
AIDS epidemic update December 2001.  
Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, Genf, Schweiz, 1-9
- (97) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995)  
A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V.  
J Immunol Methods 184: 39-51
- (98) Vyakarnam A, McKeating J, Meager A, Beverley PC (1990)  
Tumour necrosis factors (alpha, beta) induced by HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells potentiate virus replication.  
AIDS 4: 21-27
- (99) Weber B, Fall EH, Berger A, Doerr HW (1998)  
Reduction of diagnostic window by new fourth-generation human immunodeficiency virus screening assays.  
J Clin Microbiol 36: 2235-2239
- (100) Weber K, Meyer D, Grosse V, Stoll M, Schmidt RE, Heiken H (2000)  
Reconstitution of NK cell activity in HIV-1 infected individuals receiving antiretroviral therapy.  
Immunobiology 202: 172-178



- (101) Weimer R, Daniel V, Zimmermann R, Schimpf K, Opelz G (1991)  
Autoantibodies against CD4 cells are associated with CD4 helper defects in human immunodeficiency virus-infected patients.  
Blood 77: 133-140
- (102) Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA (1995)  
Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.  
Immunity 3: 673-682
- (103) Winfield JB, Winchester RJ, Kunkel HG (1975)  
Association of cold-reactive antilymphocyte antibodies with lymphopenia in systemic lupus erythematosus.  
Arthritis Rheum 18: 587-594
- (104) Wong JK, Gunthard HF, Havlir DV, Zhang ZQ, Haase AT, Ignacio CC, Kwok S, Emini E, Richman DD (1997)  
Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure.  
Proc Natl Acad Sci U S A 94: 12574-12579
- (105) Yang OO, Kalams SA, Rosenzweig M, Trocha A, Jones N, Koziel M, Walker BD, Johnson RP (1996)  
Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes.  
J Virol 70: 5799-5806
- (106) Zangerle R, Gallati H, Sarcletti M, Wachter H, Fuchs D (1994)  
Tumor necrosis factor alpha and soluble tumor necrosis factor receptors in individuals with human immunodeficiency virus infection.  
Immunol Lett 41: 229-234
- (107) Zauli G, Gibellini D, Secchiero P, Dutartre H, Olive D, Capitani S, Collette Y (1999)  
Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein sensitizes CD4(+) T lymphoid cells to apoptosis via functional upregulation of the CD95/CD95 ligand pathway.  
Blood 93: 1000-1010

## **Eigene Veröffentlichungen**

Hanitzsch R, Flade A, Maximova E, Karbaum R, Kayßer P (1997)

Enhanced light potentiation in B-type horizontal cells of the isolated rabbit retina when the PIII component of the electroretinogram is large.

Which horizontal cells do show light potentiation, are these cells GABAergic?

25<sup>th</sup> Göttingen Neurobiology Conference, 22.-25.05.1997, Göttingen, Poster

Hanitzsch R, Bligh J, Maximova E, Kayßer P, Flade A, Karbaum R (1998)

Correlations between dark suppression and functional and morphological features of horizontal cells in mammalian retina.

The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) annual meeting, 10.-15.03.1998, Fort Lauderdale, Florida, USA, Poster

Invest Ophthalmol Vis Sci 39: S561

Kayßer P, Müller MC, Brust J, Schuster D, Nebe CT (2002)

Phagocytosis of Lymphocytes in HIV Infection.

15<sup>th</sup> Heidelberg Cytometry Symposium (HCS), 17.-19.10.2002, Poster (zur Publikation angenommen)

# 7 LEBENSLAUF

## PERSONALIEN

Name und Vorname: Philipp Kayßer  
Geburtsdatum: 17.02.1974  
Geburtsort: Erlangen  
Familienstand: verheiratet mit Gaby Jasmin Kayßer, geb. Heister  
Vater: Dr. med. Gerhard Kurt Theodor Kayßer  
Mutter: Dr. med. Ingrid Elisabeth Kayßer, geb. Caesar

## SCHULISCHER UND BERUFLICHER WERDEGANG

1980 - 1984 Eichberg-Grundschule Lauterbach  
1984 - 1986 Zwangsförderstufe  
1986 - 1993 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Lauterbach  
14.06.1993 Abitur  
1993 - 1995 Grundwehrdienst und Ausbildung zum Offizier des Sanitätsdienstes

## UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 1995/96 Beginn des Studiums der Medizin an der Universität Leipzig  
11.09.1997 Ärztliche Vorprüfung  
WS 1997/98 Fortsetzung des Studiums der Medizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
27.08.1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
27.03.2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
28.05.2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## BERUFLICHE ZUSATZAUSBILDUNGEN

Leipziger Fachsprachenzertifikat Englisch UNICERT® - Stufe II für das Fachgebiet Medizin

## STIPENDIEN

1996 - 2002 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

## 8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Wisser danke ich für die Möglichkeit, das Thema im Institut für Klinische Chemie unter ausgezeichneten Bedingungen zu bearbeiten.

Herrn Dr. C. Th. Nebe danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die hervorragende fachliche Betreuung, sein persönliches Engagement und die stetige Aufforderung, die Dinge aus mehreren Perspektiven kritisch zu beleuchten und gegangene Pfade zu verlassen. Vor allem die motivierenden und ergebnisorientierten Gespräche mit ihm haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ebenfalls danke ich Frau Ingrid Brechtel und den anderen Mitarbeiterinnen des Labors für zelluläre Diagnostik (Jeanne Bommersheim, Antje Bugert, Cornelia Keup, Karin Hartmann, Marion Kiefer, Waltraud Pfirrmann) für die Unterstützung, die Anregungen und ein konstruktives Arbeitsklima.

Herrn Dr. J. Brust und den Mitarbeitern der Praxis Dres. Brust, Schuster, Queißer danke ich für die gute Kooperation bei der Untersuchung von HIV-positiven Patienten.